

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT

MÜKOLOOGIA ÕPPETOOL

Taavi Riit

PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks

Magistritöö

Juhendajad: vanemteadur Leho Tedersoo

dotsent Rein Drenkhan

Tartu 2014

Sisukord

Sissejuhatus	3
Materjalid ja meetodid	5
Seente puhaskultuurid	5
Seennakkusega taimede proovid	6
Mullaproovid	8
DNA eraldamine ja kontsentratsiooni määramine	8
PCR amplifikatsioon ja geelelektroforees	9
DNA puhastamine ja sekveneerimine	10
DNA järjestused	10
Praimerite disainimine	11
Praimerite testimine	12
Tulemused ja arutelu	13
Kokkuvõte	51
Summary in English	53
Kasutatud kirjandus	55

Sissejuhatus

Taimede seenpatogeenid moodustavad suure ja mitmekesise organismide rühma, mis hõlmab väga erinevate elustrateegiatega seeneliike (Burdon, Silk 1997).

Seenpatogeenid avaldavad olulist mõju nii taimekoosluste kujunemisele (Muller-Landau 2014) kui ka erinevate taimekasvatusega seotud põllumajandusvaldkondade tootlikkusele (Palm 2001), mõjutades erinevate interaktsioonide kaudu oma peremeesliikide füsioloogiat ja ellujäämist (Rottstock et al. 2014).

Seenpatogeenide poolt taimekultuuridele tekitatava kahju vähendamiseks või kahjustuste ennetamiseks on oluline patogeensete liikide leviku pidev ja täpne jälgimine. Seeneliikide leviku efektiivse kaardistamise eelduseks on patogeensete liikide täpne määramine erinevatest bioloogilistest proovidest. Traditsionaalsed taimede seenpatogeenide taksonoomilise määramise meetodid, mis põhinevad erinevatel morfoloogilistel parameetritel on aeganõudvad ning eeldavad aastatepikkust väljaõpet ja kogemusi, et tagada patogeensete liikide täpne identifitseerimine (Kang et al. 2010). Seente määramist fenotüübi põhjal komplitseerivad ka morfoloogiliste tunnuste sõltuvus keskkonnatingimustest (Kang et al. 2010) ja probleemid paljude liikide kasvatamisel laboritingimustes (Bridge, Spooner 2001). Patogeenide määramine morfoloogiliste tunnuste põhjal võib olla võimatu isolaatide puhul, mis ei sporuleeru (Watrud et al. 2006), ning krüptiliste liikide puhul, mis on morfoloogiliselt identsed, kuid eristuvad DNA järjestuste põhjal (Shivas, Cai 2012). Krüptilised liigid on sageli erineva patogeensusega, nakatavad erinevaid peremeesliike ja levivad erinevates geograafilistes regioonides (Shivas, Cai 2012), seega on nende eristamine oluline.

Endofüütsete, saproobsete ja patogeensete seente määramiseks, mitmekesisuse hindamiseks ja evolutsiooni uurimiseks kasutatakse järjest enam molekulaarseid meetodeid, mis põhinevad DNA sekveneerimisel ja fülogeneetilistel analüüsidel (Jeewon et al. 2013). Võrreldes traditsionaalsete määramismeetoditega on molekulaarsed meetodid üldjuhul kiiremad, spetsiifilisemad, sensitiivsemad ja täpsemad, ning nende meetodite kasutamine ja tulemuste tõlgendamine ei eelda taksonoomiaalseid eriteadmisi (Capote et al. 2012). Kõige tundlikum kasutuses olev molekulaarne meetod taimepatogeenide tuvastamiseks põhineb polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) (Capote et al. 2012). PCR võimaldab detekteerida spetsiifilist DNA järjestust ja sünteesida sellelt miljoneid koopiaid kasutades spetsiifilisi oligonukleotiide (praimereid), desoksüribonukleotiid-trifosfaate ja

sobivas puhvris olevat termostabiilset DNA polümeraasi ning viies läbi korduvaid erinevatel temperatuuridel toimuvaid denaturatsiooni, polümerisatsiooni ja elongatsiooni tsükleid (Mullis, Faloona 1987). PCR reaktsioonis amplifitseeritud DNA produkt visualiseeritakse harilikult elektroforeesil DNA biheeliksiga interkaleeruva värvi (EtBr, SYBR Green) juuresolekul kasutades maatriksina agaros- või polüakrüülamiidgeeli. Sihtmärgiks oleva patogeeni olemasolu proovis näitab spetsiifilise suurusega DNA bänd geelil.

PCR reaktsiooni spetsiifilisus sõltub kasutatavate praimerite nukleotiidsetest järjestustest ja reaktsiooni tingimustest. Paljude oluliste taimede seenpatogeenide tuvastamiseks vajalikud spetsiifilised praimerid hetkel puuduvad ja mitmete varem disainitud liigspetsiifiliste praimerite kasutamine on osutunud problemaatiliseks (Drenkhan 2013, suuliselt autorile). Selle töö eesmärgiks oli disainida liigi- ja perekonnasepsiifilised praimerid 17 patogeense või patogeenidele fenotüübiliselt ja geneetiliselt lähedase mitte-patogeense seeneliigi- ja perekonna (vt tabel 1) kiireks ja täpseks tuvastamiseks erinevatest bioloogilistest proovidest.

Tabel 1

Spetsiifiliste praimerite sihtmärgiks olevad taksonid, nende patogeensus ja peremeesliigid

Perekond/liik	Patogeen (jah/ei)	Olulisemad peremeesliigid
<i>Alternaria</i> (Fr.) Nees	Jah (Mangain et al. 2013)	Aedviljad, lehtpuud
<i>Armillaria</i> (Fr.) Fries	Jah (Mallett 1990)	Okaspuud, lehtpuud
<i>Fusarium</i> (Fr.) Link.	Jah (Akanmu et al. 2013)	Teraviljad, okaspuud, lehtpuud
<i>Diplodia sapinea</i> (Fr.) Fuckel	Jah (Blodgett, Stanosz 1997)	<i>Pinaceae</i>
<i>Diplodia scrobiculata</i> J. de Wet, Slippers & M.J. Wingf.	Jah (Blodgett, Stanosz 1997)	<i>Pinaceae</i>
<i>Dothistroma pini</i> Hulbary	Jah (Groenewald et al. 2007)	<i>Pinus</i>
<i>Gremmeniella abietina</i> (Lagerb.) M. Morelet	Jah (Karadžić, Milanović 2008)	<i>Pinaceae</i>
<i>Herpotrichia juniperi</i> (Duby) Petr.	Jah (Schneider, Holdenrieder 2009)	<i>Pinaceae</i>
<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	Jah (Korhonen et al. 1998)	<i>Pinaceae</i>
<i>Hymenoscyphus albidus</i> (Gillet) W. Phillips	Ei (Queloz et al. 2010)	<i>Fraxinus</i>
<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i> Queloz et al.	Jah (Queloz et al. 2010)	<i>Fraxinus</i>
<i>Lirula macrospora</i> (Hartig) Darker	Jah (Hennon 1990)	<i>Picea</i>
<i>Lophodermium conigenum</i> (Brunaud) Hiltzer	Ei (Diwani, Millar 2007)	<i>Pinus</i>
<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad.) Chevall.	Ei (Diwani, Millar 2007)	<i>Pinus, Larix</i>
<i>Lophodermium seditiosum</i> Minter, Staley & Millar	Jah (Diwani, Millar 2007)	<i>Pinus</i>
<i>Mycosphaerella dearnessii</i> M.E. Barr	Jah (La Porta 2000)	<i>Pinus</i>
<i>Phellinus tremulae</i> (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov	Jah (Niemela 1974)	<i>Populus</i>

Materialid ja meetodid

Seente puhaskultuurid

Praimerite testimisel kasutatud puhaskultuurid olid valdavalt pärit Eesti Maaülikooli kogust, CBS (The Centraalbureau voor Schimmelcultures) kollektisioonist ja Eesti Seenekogust (vt tabel 2).

Tabel 2

Praimerite testimisel kasutatud puhaskultuurid

Liik	Kultuuri kood	Peremeestaim	Leiukoht	Aasta	Koguja/isoleerija
<i>Alternaria alternata</i>	145707	<i>F. pensilvanica</i>	Eesti	1905	R. Drenkhan/M. Tee
<i>Alternaria infectoria</i>	TU-3 TFC 2013-46	na	na	na	na
<i>Alternaria tenuissima</i>	140117	<i>B. pendula</i>	Eesti	2013	P. Kase/K. Jürimaa
<i>Armillaria borealis</i>	145526	<i>P. abies</i>	Eesti	2013	E. Pilt/M. Mälg
<i>Armillaria cepistipes</i>	140824	<i>P. abies</i>	Eesti	2011	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Armillaria gallica</i>	147879/Russia 07021	na	Venemaa	2007	N. Selichnik
<i>Armillaria ostoyae</i>	145516	<i>B. pendula</i>	Eesti	2013	E. Pilt/M. Mälg
<i>Armillaria ostoyae</i>	145517	<i>B. pendula</i>	Eesti	2013	E. Pilt/M. Mälg
<i>Diplodia mutila</i>	145586	<i>F. pensilvanica</i>	Eesti	2013	M. Tee
<i>Diplodia sapinea</i>	142472	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2012	E. Pilt/K. Adamson
<i>Diplodia scrobiculata</i>	148090/CBS 119939	<i>P. radiata</i>	Itaalia	2004	B. T. Linaldeddu
<i>Diplodia seriata</i>	148086/CBS 112555	<i>V. vinifera</i>	Portugal	1997	A. J. L. Phillipis
<i>Dothistroma pini</i>	146874	<i>P. nigra</i>	Ukraina	2013	K. Davydenko/K. Adamson
<i>Flammulina velutipes</i>	175721/TFC 2000-19	<i>S. caprea</i>	na	2000	A. Raitviir/A. Kollom
<i>Fusarium avenaceum</i>	141036	<i>B. pendula</i>	Eesti	2011	E. Tetlov/K. Jürimaa
<i>Fusarium culmorum</i>	KV-6 TFC 2013-54	na	na	na	na
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	139484	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2010	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Gremmeniella abietina</i>	139221	<i>P. mugo</i>	Island	2010	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Herpotrichia juniperi</i>	148088/CBS 468.64	<i>P. mugo</i>	Šveits	1959	G. Bazzigher
<i>Herpotrichia parasitica</i>	CBS 451.73	<i>A. alba</i>	Saksamaa	1973	C. Freyer/H.A. van der Aa
<i>Heterobasidion abietinum</i>	147873/00096 Romania	na	Rumeenia	2000	La Porta, Grudnicki
<i>Heterobasidion annosum</i>	146992	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2013	E. Pilt/K. Adamson
<i>Heterobasidion annosum</i>	146561	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2013	E. Pilt/K. Adamson
<i>Heterobasidion annosum</i>	146550	<i>P. abies</i>	Eesti	2013	E. Pilt/K. Adamson
<i>Heterobasidion annosum</i>	146739	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2013	E. Pilt/K. Adamson
<i>Heterobasidion parviporum</i>	146957	<i>P. abies</i>	Eesti	2013	E. Pilt/K. Adamson
<i>Hymenoscyphus albidus</i>	146421/09-111/1/4	<i>F. excelsior</i>	Norra	2009	T. Pousi/H. Solheim
<i>Hymenoscyphus albidus</i>	146420/09-124/3/1	<i>F. excelsior</i>	Norra	2009	T. Pousi/O. Olsen
<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	139078	<i>F. excelsior</i>	Eesti	2009	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Lewia infectoria</i>	146458	<i>F. mandshurica</i>	Eesti	2013	M. Tee
<i>Lirula macrospora</i>	147379	<i>P. abies</i>	Eesti	na	R. Drenkhan
<i>Lophodermium conigenum</i>	146138	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2009	R. Drenkhan/K. Jürimaa

<i>Lophodermium piceae</i>	147880/Finland Pi458	<i>P. abies</i>	Soome	2010	M. Müller
<i>Lophodermium pinastri</i>	139913	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2009	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Lophodermium pinastri</i>	139914	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2009	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Lophodermium seditiosum</i>	140857	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2009	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Mycosphaerella dearnessii</i>	139410	<i>P. ponderosa</i>	Eesti	2010	R. Drenkhan/K. Jürimaa
<i>Mycosphaerella microspora</i>	140818	<i>P. mugo</i>	Eesti	2011	E. Tetlov/K. Jürimaa
<i>Neonectria fuckeliana</i>	145693	<i>P. abies</i>	Eesti	2013	T. Maaten/K. Adamson
<i>Neonectria radicola</i>	140116	<i>B. pendula</i>	Eesti	2011	P. Kask/K. Jürimaa
<i>Phellinus alni</i>	191311/2005-20	na	na	na	na
<i>Phellinus cinerea</i>	166678/97-10	na	na	na	na
<i>Phellinus igniarius</i>	191207/2005-5	na	na	na	na
<i>Phellinus nigricans</i>	191220/2005-10	na	na	na	na
<i>Phellinus populicola</i>	TFC 1981-048	<i>P. tremula</i>	na	1981	R. Aguraiuja
<i>Phellinus tremulae</i>	143609	<i>P. tremula</i>	Eesti	2013	S. Lokko/K. Jürimaa
<i>Sinococcus conigenus</i>	147877/Sin con Italy2	na	Itaalia	na	A. Lilja
<i>Stemphylium solani</i>	148096/CBS 408.54	<i>L. esculentum</i>	USA	1952	C. F. Andrus
<i>Ulocladium castanea</i>	148098/CBS 124390	<i>C. mollissima</i>	Hiina	na	X. G. Zhang
<i>Xerula radicata</i>	148091/CBS 557.79	na	Prantsusmaa	1960	R. Kühner

na - andmed pole saadaval; CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures

Seennakkusega taimede proovid

Disainitud praimerite efektiivsust sihtmärgiks oleva liigi DNA tuvastamisel kontrolliti seentega nakatunud peremeestaimedest võetud proovidel (vt tabel 3). *Diplodia scrobiculata* spetsiifiliste praimerite puhul kontrolliti efektiivsust kunstlikult nakatatud puidutükkidest võetud proovidel, sest looduslikult nakatunud substraati ei õnnestunud leida. Praimerite sihtmärgiks olevate liikide DNA olemasolu substraadi proovides tõestati proovidest eraldatud DNA sekveneerimise teel. Kõigil juhtudel, välja arvatud *Diplodia* nakkusega proovide puhul, andis NCBI ((National Center for Biotechnology Information) programm BLAST (Altschul et al. 1990) sekveneerimisel saadud järjestuste parimaks vasteks sihtmärgiks olnud seeneliigi DNA järjestuse. *Diplodia* nakkusega proovide sekventsids osutusid liiga lühikeseks, et teha kindlaks, kas tegemist on *D. sapinea* või *D. scrobiculata* DNA järjestustega.

Tabel 3

Analüüsitud seennakkusega substraatide proovid

Patogeen/endofüüt	Proovi ID	Peremeestaim	Riik	Aasta	Proovi võtja
<i>Alternaria</i>	S6	<i>B. pendula</i> / <i>A. incana</i>	Eesti	2014	E. Tetlov
<i>Armillaria</i>	S2	<i>P. abies</i>	Eesti	2014	K. Adamson
<i>Fusarium</i>	S3	<i>B. pendula</i> / <i>A. incana</i>	Eesti	2014	E. Tetlov
<i>D. sapinea</i>	S15	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>D. scrobiculata</i>	S46	kunstlikult nakatatud <i>P. sylvestris</i> puidutükk	Itaalia	2014	K. Adamson
<i>D. pini</i>	S26	<i>Pinus nigra</i> spp <i>pallasiana</i>	Ukraina	2013	K. Davydenko
<i>G. abietina</i>	S1	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>H. juniperi</i>	S45a, S45b	<i>P. abies</i>	Eesti	2013	E. Tetlov
<i>H. annosum</i>	S24a, S24b	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2014	T. Drenkhan
<i>H. albidus</i>	S20	<i>F. excelsior</i>	Leedu	1966	A. Raitviir
<i>H. pseudoalbidus</i>	S4	<i>F. excelsior</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>L. macrospora</i>	S27	<i>P. abies</i>	Eesti	2013	R. Drenkhan
<i>L. conigenum</i>	S29	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>L. pinastri</i>	S12	<i>P. sylvestris</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>L. seditiosum</i>	S14	<i>P. sylvestris</i> / <i>P. nigra</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>M. dearnessii</i>	S5	<i>P. mugo</i>	Eesti	2014	R. Drenkhan
<i>P. tremulae</i>	S17a, S17b	<i>P. tremula</i>	Eesti	2014	K. Adamson

Mullaproovid

Praimerite üldise spetsiifilisuse testimiseks kasutati kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt tabel 4).

Tabel 4

Mullaproovid praimerite spetsiifilisuse testimiseks

Proovi nr	Kood	Päritolu	Aasta	Koguja
1	S246	Eesti	2013	L. Tedersoo
2	S251	Eesti	2013	L. Tedersoo
3	S252	Eesti	2013	L. Tedersoo
4	G3412	Eesti	2013	L. Tedersoo
5	G3413	Eesti	2013	L. Tedersoo
6	G3485	Itaalia, Pantelleria	2013	L. Tedersoo
7	G3490	Itaalia, Pantelleria	2013	L. Tedersoo
8	G3492	Itaalia, Pantelleria	2013	L. Tedersoo
9	G3497	Itaalia, Pantelleria	2013	L. Tedersoo
10	G3506	Itaalia, Pantelleria	2013	L. Tedersoo

DNA eraldamine ja kontsentratsiooni määramine

Seente puhaskultuuridest eraldati DNA kasutades ammooniumsulfaat lüüsi meetodit (Neumann et al. 1992). 200 µl PCR tuubis segati kokku 100 µl 10x Reaction buffer B no MgCl₂ (0,8 M Tris-HCl, 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,2% w/v Tween-20) (OÜ Solis Biodyne, Tartu, Estonia) ja 2,5 µl Proteinase K >600 U/mL (~20 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Segule lisati puhaskultuurist võetud seenepartikkel ja inkubeeriti segu 16 tundi temperatuuril 56 °C kasutades Eppendorf 5341 või 6321 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa) PCR aparaati. Peale inkubeerimist kuumutati segu samas masinas 15 min temperatuuril 98 °C ja tsentrifuugiti seejärel 2 min kiirusel 8000

pööret minutis kasutades tsentrifuugi Eppendorf 5424 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Seejärel pipeteeriti 80 µl eluaati ümber 1,5 ml tuubi ning säilitati eraldatud DNA proov temperatuuril 4 °C. PCR reaktsioonides kasutamiseks lahjendati eraldatud DNA proove 10x kasutades steriilset vett. Kõigi praimerite testimisel kasutatud puhaskultuuride DNA proovide kvaliteeti kontrolliti PCR reaktsioonis kasutades universaalseid ITS regiooni amplifitseerivaid primereid ITS1F (Gardes ja Bruns 1993) ja ITS4 (White et al. 1990).

Seennakkusega peremeestaimede proovidest DNA eraldamiseks lõigati nakatunud okkad ca 1 cm pikkusteks ja nakatunud puidu ning võsude puhul kasutati skalpelli, et lõigata materjalist õhukesi laaste. Eraldamiseks kaaluti välja 0,2 g materjali. Kaalutud materjal pandi 2 ml tuubi, lisati kaks 3,2 mm diameetriga roostevabast terasest kuuli (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) ning purustati materjal 10 min jooksul kasutades Retsch Mixer Mill MM400 (Retsch, Haan, Saksamaa) raputit. Purustatud materjalist DNA eraldamiseks kasutati MO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit-i (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) vastavalt tootja protokollile.

Mullaproovidest DNA eraldamiseks kaaluti esmalt välja 2 g materjali, mis purustati seejärel raputis 3,2 mm roostevabast terasest kuulide abil sarnaselt varem kirjeldatule. Peenestatud mullaproovidest eraldati DNA kasutades MO BIO PowerMax Soil DNA Isolation Kit-i (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) vastavalt tootja protokollile.

Puhaskultuuridest eraldatud DNA proovide DNA kontsentratsioon määrati fluoromeetriselt kasutades Qubit 2.0 fluoromeetrit ja Qubit dsDNA BR kaheahelalise DNA kontsentratsiooni mõõtmise süsteemi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, CA, USA).

PCR amplifikatsioon ja geelelektroforees

PCR temperatuuritsükliid viidi läbi kasutades aparate Eppendorf 5341 ja 6321 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). 25 µl reaktsioonisegu sisaldas 18 µl vett, 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Mastermix (10 mM MgCl₂) (OÜ Solis Biodyne, Tartu, Estonia), 0,5 µl mõlemat praimerit (20 µM) ja 1 µl sihtmärk DNA-d. Esmene denatureerimine viidi läbi temperatuuril 95 °C 15 min jooksul. Sellele järgnesid korduvad tsükliid, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 95 °C 30 s jooksul, praimerite seondumisest 30 s jooksul

(temperatuur varieerus sõltuvalt kasutatavatest praimeritest) ja elongatsioonist temperatuuril 72 °C 1 min kestel. PCR tsüklid lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C, mis kestis 10 min.

PCR produktid separeeriti geelelektroforeesil 1,5% agaroosgeelil (SeaKem LE Agarose, Lonza Group Ltd, Basel, Šveits) 1% TBE puhvris. Geeli voolutati Biometra Compact M elektroforeesisüsteemis (Biometra GmbH, Goettingen, Saksamaa) voolupingega 5 V/cm. Produktid markeeriti etiidiumbromiidiga (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ja visualiseeriti UV valguses kasutades Bio-Vision 3026 WL süsteemi (Vilber Lourmet, Torcy, Prantsusmaa).

PCR produktide puhastamine ja sekveneerimine

Sekveneerimisele saadetavad PCR produktid puhastati ExoSAP meetodil (Bell 2008). 200 µl PCR tuubis segati ühe puhastatava PCR proovi kohta kokku 1 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase reagenti (1 U/ µl) ja 0,5 µl reagenti Exonuclease I (20 U/ µl) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, CA, USA). Segu segati vortexil ja pipeteeriti puhastatavasse PCR proovi. Reaktsioonisegu segati vortexil ja tsentrifuugiti paari sekundi vältel kiirusel 3000 pööret minutis kasutades tsentrifuugi Eppendorf 5424 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Seejärel inkubeeriti proove PCR aparaadis Eppendorf 5341 või 6321 temperatuuril 37 °C 45 min jooksul ning seejärel temperatuuril 85 °C 15 min jooksul.

Seennakkusega substraatide DNA proovide PCR produktide ja spetsiifiliste praimeritega positiivse tulemuse andnud mullaproovide PCR produktide sekveneerimine teostati ettevõttes Macrogen (Macrogen Europe, Amsterdam, Holland) kasutades selle töö raames disainitud praimereid.

DNA järjestused

Liigi- ja perekonnaspetsiifiliste praimerite disainimiseks sobivad DNA markerid leiti NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank andmebaasis olevatest DNA järjestustest. Praimerite disainimiseks kasutati tuumsete ja mitokondriaalsete ribosoomi subühikute geenide DNA järjestusi, mis teadaolevalt omavad sobivat liigisisest ja liikidevahelist varieeruvust seeneliikide eristamiseks (Schoch et al.

2012). Andmebaasist laeti alla kõik sihtmärgiks oleva liigi või perekonna ribosomaalsete ITS (internal transcribed spacer), SSU (small subunit) ja LSU (large subunit) regioonide järjestused ning nimetatud DNA järjestustele kõige sarnasemaid ortoloogseid järjestusi omavate fülogeneetiliselt lähedaste liikide DNA järjestused. Järjestused joondati kasutades programmi MAFFT versiooni 7.045 algoritmi „G-INS-i“ (Kato et al. 2002).

Praimerite disainimine

Joondatud järjestusi analüüsiti kasutades programmi SeaView 4 (Gouy et al. 2010), et leida sobivat liigisisest ja liikidevahelist varieeruvust sisaldav regioon, mille põhjal oleks võimalik disainida spetsiifilised PCR praimerid. Praimerite järjestused valiti manuaalselt. Järjestuste valimisel võeti eesmärgiks, et vähemalt üks praimeritest, päripidine või äraspidine, sisaldaks 3' otsas minimaalselt ühte ja optimaalselt kahte või enam positsiooni, mis oleksid mitte-komplementaarsed kõigi fülogeneetiliselt lähedaste liikide vastavate positsioonide nukleotiididega (Stadhouders et al. 2010). Kui praimeri 3' ots sisaldas ainult ühte lähedaste liikide ortoloogsete järjestustega mitte-komplementaarset positsiooni ja see ei olnud 3' terminaalne nukleotiid, siis valiti järjestus nii, et see sisaldaks vähemalt ühte mitte-komplementaarset positsiooni ka praimeri 5' pooles. Praimerite disainimisel arvestati ka konkreetsete mitte-komplementaarsete aluspaaride tüüpi, et tagada sihtmärgiks mitte olevate järjestuste võimalikult efektiivne diskrimineerimine PCR reaktsioonis (Stadhouders et al. 2010). Parema spetsiifilisuse tagamiseks pöörati tähelepanu sellele, et praimerite 3' otsade GC sisaldus ei oleks väga kõrge (üks kuni kolm G või C nukleotiidi viimases viies positsioonis) (Remm et al. 2010). Praimerite GC sisaldust, arvutuslikke denatureerumise temperatuure (T_m) ja dimeeride ning nõelasilma struktuuride stabiilsust analüüsiti kasutades programmi OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, Iowa, USA) ja sobivate parameetritega praimerjärjestuse valimisel lähtuti Dieffenback et al. 1993 kirjeldatud põhimõtetest. Praimerite denatureerumise temperatuuride analüüsimisel lähtuti OligoAnalyzer 3.1 järgi arvutatud temperatuuridest, võrdluseks arvutati denatureerumistemperatuurid ka Marmur'i valemi järgi (Marmur ja Doty 1962), mille puhul denatureerumise temperatuur sõltub ainult praimerite GC nukleotiidide sisaldusest. Väljavalitud praimerjärjestuste spetsiifilisust kontrolliti *in silico* kasutades NCBI BLAST programmi (Altschul et al. 1990).

ja vajadusel korrigeeriti praimerite järjestusi tagamaks kõrgemat spetsiifilisust. Disainitud praimerid telliti ettevõttest Microsynth AG (Balgach, Šveits).

Praimerite testimine

Praimerite optimaalse seondumistemperatuuri ja kõrgeimat spetsiifilisust tagava seondumistemperatuuri määramiseks viidi läbi PCR reaktsioonid seondumistemperatuuridel 50-72 °C. Seondumistemperatuuride määramisel kasutati puhaskultuuridest eraldatud DNA-d. Optimaalseks seondumistemperatuuriks määrati temperatuuri, mille juures PCR produkti vööt geelil oli visuaalselt tugevaim. Kõrgeimat spetsiifilisust tagavaks seondumistemperatuuriks määrati kõrgeim seondumistemperatuur, mille juures PCR produkti vööt geelil oli veel selgelt nähtav. Kõrgeimat spetsiifilisust tagava seondumistemperatuuri valimisel oli eesmärgiks optimaalse efektiivsuse ja spetsiifilisuse suhte tagamine 35 PCR tsükli korral.

Spetsiifiliste praimerite efektiivsust sihtmärgiks olevate liikide või perekondade DNA tuvastamisel erinevatest bioloogilistest proovidest testiti lisaks puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidele ka seentega nakatunud looduslikeset substraatidest eraldatud DNA proovidel. *D. scrobiculata* puhul kasutati looduslikust substraadist eraldatud DNA asemel kunstlikult nakatatud puiduklotsidest eraldatud DNA-d. Spetsiifiliste praimeritega testimisel positiivse tulemuse andnud DNA proovide PCR produktid sekveneeriti, et teha kindlaks, kas praimeritega amplifitseeritud DNA kuulub sihtmärgiks olnud taksonile.

Praimerite tundlikkuse määramisel kasutati puhaskultuuridest eraldatud DNA proovide 10x lahjenduste seeriat. Algse kontsentratsiooniga proovidest tehti neli lahjendust. Lahjenduste tegemisel pipeteeriti 1,5 ml tuubidesse 90 µl steriliseeritud vett, millele lisati 10 µl algset DNA proov. Segu segati vortexil 10 sek jooksul ja seejärel korrati protsessi järgmise lahjenduse tegemisel. Minimaalseks detekteeritavaks DNA kontsentratsiooniks määrati madalaim kontsentratsioon, mille juures oli PCR produkti vööt geelil visuaalselt tuvastatav.

Disainitud praimerite spetsiifilisuse kontrollimiseks testiti praimereid kasutades PCR reaktsioonis Eestist ja Itaaliast kogutud kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d. Spetsiifiliste praimeritega testimisel positiivse tulemuse andnud mullaproovide PCR produktid sekveneeriti, et teha kindlaks, millisest liigist või perekonnast amplifitseeritud DNA lõik pärineb. Spetsiifilisust testiti ka fülogeneetilisel lähedaste või sageli samasid peremeestaimi nakatavate seeneliikide DNA peal.

Tulemused ja arutelu

Tabel 5

Praimerite järjestused, arvutatud T_m ja soovitatav seondumistemperatuur

Praimer	Järjestus	Arvutatud T _m	Soovituslik A _t
Alter-F	5' CTTGCTGAATTATTACACCCTTGTC 3'	54 °C	64 °C
Alter-R	5' AATGGATGCTAGACCTTTGCTGAT 3'	57 °C	64 °C
Armi-F	5' GCACGTTTCGACGTGTTGCGTTC 3'	62 °C	72 °C
Armi-R	5' GCAAGGTGCGTTCAAAGACTCG 3'	59 °C	72 °C
Fusa-F	5' TTCTTAGTGGAACCTTCTGAGTA 3'	51 °C	52 °C
Fusa-R	5' GTGTAAACTACTACGCAATGGA 3'	53 °C	52 °C
DiSapi-F	5' CCCTTATATATCAAACCTATGCTTTGT 3'	51 °C	61 °C
Diplo-R	5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'	52 °C	61 °C
DiScro-F	5' CCCTTATATATCAAACCTAATGTTTGCAT 3'	52 °C	60 °C
Diplo-R	5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'	52 °C	60 °C
DoPini-F	5' GGTCATCAAACACTGCATCTATG 3'	54 °C	66 °C
DoPini-R	5' ACGCCCAATACCAAGCTA 3'	54 °C	66 °C
GrAbi-F	5' GGAGGACCCCAACCTATG 3'	55 °C	64 °C
GrAbi-R	5' GTCTCCCGAGCCCTGTAG 3'	57 °C	64 °C
HeJuni-F	5' GCTTTGGTGTCGGCAGCA 3'	59 °C	70 °C
HeJuni-R	5' GGAAAACCCCAAGATGAGCAACTAC 3'	58 °C	70 °C
HetAn-F	5' TCGGTCGGGTTCTTTTGAC 3'	55 °C	66 °C
HetAn-R	5' CACAATCGTGGCGTACCA 3'	55 °C	66 °C
HALbi-F	5' GACCGTGCCTGCTAGAGGAT 3'	59 °C	70 °C
HALbi-R	5' GGTTTCTGGCAAGACACCTC 3'	56 °C	70 °C
HyPse-F	5' CTTTAGCAGGTCGCCCTCT 3'	57 °C	68 °C
HyPse-R	5' TGCTGGCAAGACACCGCAA 3'	61 °C	68 °C
LiMa-F	5' GAGATGAAATTCTTTGATACCATG 3'	50 °C	60 °C
LiMa-R	5' CGCTTGTAACATCACCGTTG 3'	54 °C	60 °C
LoCon-F	5' CTTGCGGCTCTGTTCTTC 3'	53 °C	64 °C
LoCon-R	5' GCCACTGATTTTGAAGCGA 3'	54 °C	64 °C
LoPi-F	5' CTTACGGAGTAGAGATGAAATC 3'	50 °C	64 °C
LoPi-R2	5' CATCATTATCTGCATGGACTACA 3'	53 °C	64 °C
LoSe-F	5' ACAGCGCCAGCGGATTGA 3'	60 °C	67 °C
LoSe-R	5' CCTGCTGTCCTTCCCTACCA 3'	59 °C	67 °C
MyDe-F	5' GCCATCTATCAAACCTCTGCATTAC 3'	54 °C	66 °C
MyDe-R	5' GCGAACTCCCTAGCGAAAATGTC 3'	56 °C	66 °C
PheTre-F	5' TCGTCGGTGAACACTTCAACTA 3'	56 °C	68 °C
PheTre-R	5' CTTGTTAGGCAAGCGTCCAG 3'	56 °C	68 °C

Arvutatud T_m – arvutuslik denatureerumistemperatuur OligoAnalyzer 3.1 järgi

Soovituslik A_t – kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur spetsiifilisuse tagamiseks

Perekonna *Alternaria* spetsiifilised PCR praimerid

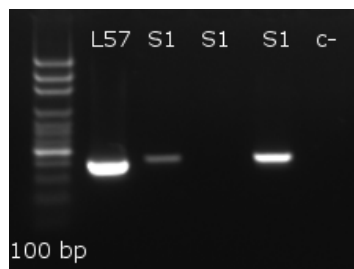
Perekonna *Alternaria* spetsiifilised PCR praimerid disainiti *Alternaria alternata* ja *Alternaria tenuissima* ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimeri (Alter-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 42 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ning äraspidise praimeri (Alter-R) ITS2 regioonis 19 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

Alter-F ja Alter-R praimerid on 24 nukleotiidi pikad ning praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi mõlema praimeri puhul 68 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi vastavalt 54 °C ja 57 °C. Mõlema praimeri GC sisaldus on 42%. Praimeritega amplifitseeritava kaheahelalise DNA produkti pikkus on ligikaudu 423 bp. Alter-F poolt moodustatavate sekundaarstruktuuride delta G väärtused on -0,59 kcal/mol nõelasilma struktuuri puhul ja -6,59 kcal/mol homodimeeri puhul. Alter-R jaoks on vastavad väärtused -0,29 kcal/mol ja -4,16 kcal/mol. Praimerite stabiilseima heterodimeeri delta G väärtus on -3,53 kcal/mol.

Praimerite efektiivsust sihtmärgiks olevate *Alternaria* liikide detekteerimisel kontrolliti kasutades *A. alternata* ja *A. tenuissima* puhaskultuuridest eraldatud DNA-d ning *Alternaria* perekonna liikide poolt nakatatud arukase (*Betula pendula*) ja halli lepa (*Alnus incana*) võrsetest eraldatud DNA-d. *Alternaria* tuvastamine proovidest õnnestus nii puhaskultuuride kui ka nakatunud substraadi korral (vt joonis 1). Eksperimentaalselt osutus praimerite optimaalseks seondumistemperatuuriks ja ühtlasi ka kõrgeimaks efektiivseks seondumistemperatuuriks 64 °C (vt joonis 2). Minimaalne detekteeritav DNA kogus oli *A. alternata* ja *A. tenuissima* jaoks vastavalt 26,6 fg ja 802 pg reaktsioonisegu kohta (vt joonis 3). Praimerite madal tundlikkus *A. tenuissima* puhaskultuurist eraldatud DNA-d kasutades tulenes tõenäoliselt puhastatud DNA proovi madalast kvaliteedist. Ka universaalsed seentespetsiifilised ITS regiooni amplifitseerivad praimerid ITS1f ja ITS4 andsid PCR reaktsioonil *A. tenuissima* DNA-d kasutades nõrga bändi. Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 64 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite disainimisel kontrolliti nende spetsiifilisust *in silico* võrreldes perekonna *Alternaria* markeriteks valitud DNA järjestusi teiste taksonite sarnaste järjestustega ning empiiriliselt viies läbi PCR reaktsioonid kasutades kümnest mullproovist puhastatud DNA-d (vt joonis 4) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d - *Stemphylium solani*, *Ulocladium castaneae*, *Armillaria ostoyae* (vt joonis 5). Spetsiifilisuse testimisel andsid positiivse tulemuse kümnest

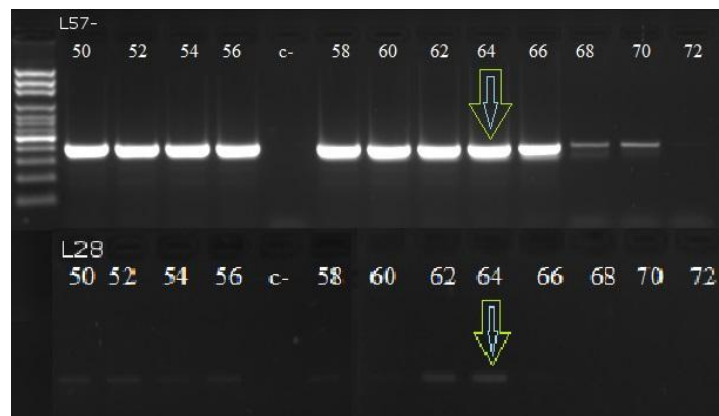
mullaproovist 8 ning kõigil juhtudes vastas amplifitseeritud produkti pikkus positiivse kontrollina kasutatud *A. alternata* puhaskultuurist amplifitseeritud produkti pikkusele.

Joonis 1



Test nakatunud substraadil
L1 – *A. alternata*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
DNA
c- – negatiivne kontroll

Joonis 2



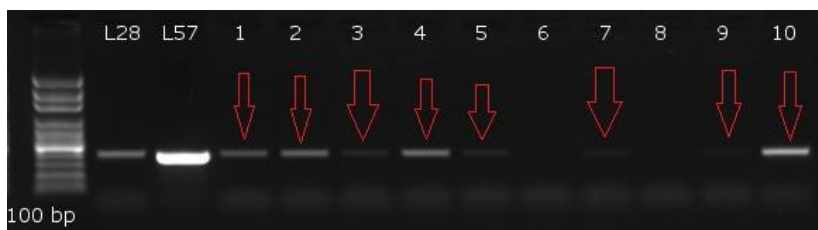
Seondumistemperatuuride (At) analüüs
L3 – *F. sporotrichoides*; L8 – *F. avenaceum*
50-72 – At (°C); c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At; sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 3



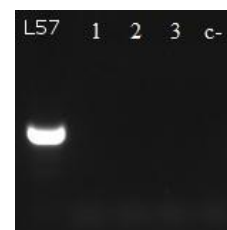
Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L28 – *A. tenuissima* algne kontsentratsioon
(802 pg/μl); L57 – *A. alternata* algne
kontsentratsioon (266 pg/μl; 1-4 – 10x
lahjenduste seeria; c- – negatiivne kontroll

Joonis 4



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 L28 – positiivne kontroll (*A. tenuissima* puhaskultuuri DNA)
 L57 – positiivne kontroll (*A. alternata* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA
 punased nooled – positiivseks tulemuse andnud mullaproovid

Joonis 5



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhas-kultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L57 – *A. alternata* puhaskultuuri DNA
 1 – *S. solani* puhaskultuuri DNA
 2 – *U. castaneae* puhaskultuuri DNA
 3 – *A. ostoyae* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

Perekonna *Armillaria* spetsiifilised PCR praimerid

Armillaria ehk külmaseente spetsiifilised PCR praimerid disainiti ITS1 ning ITS2 regioonide põhjal. Praimerjärjestuste valimisel võeti aluseks perekonna *Armillaria* nelja enamlevinud patogeense liigi DNA järjestused – *A. ostoyae*, *A. borealis*, *A. cepistipes* ja *A. gallica*. Praimeripaari spetsiifilisuse tagab päripidine praimer Armi-F, äraspidine praimer Armi-R ei ole *Armillaria* spetsiifiline (vt tabel 5). Päripidise praimer (Armi-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 55 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ning äraspidise praimer (Armi-R) seondumissait paikneb ITS2 regioonis 428 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest.

Nii päripidine kui äraspidine praimer on 22 nukleotiidi pikad ning praimerite GC nukleotiidide sisaldused on 59% ja 54,5%. *Armillaria* spetsiifiliste praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on konventsionaalse Marmur'i valemi järgi 70 °C ja 68 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 62 °C ja 59 °C. Praimerite poolt amplifitseeritava produkti eeldatav pikkus on ligikaudu 195 bp. Armi-F moodustatava stabiilseima nõelasilma struktuuri ja stabiilseima homodimeeri delta G väärtused on vastavalt -4,03 kcal/mol ning -8,25 kcal/mol. Armi-R puhul on vastavad suurused -0,23 kcal/mol ja -5,09 kcal/mol. Armi-F ja Armi-R moodustatava stabiilseima heterodimeeri delta G väärtus on -7,04 kcal/mol.

Praimerite võimet amplifitseerida sihtmärgiks olevat DNA regiooni *Armillaria* liikides kontrolliti kasutades PCR reaktsioonis nelja *Armillaria* liigi (*A. ostoyae*, *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica*) puhaskultuuridest eraldatud DNA-d ning *Armillaria* nakkusega hariliku kuuse (*Picea abies*) puidust eraldatud DNA-d (vt joonis 6). Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 66 °C ning kõrgeimat spetsiifilisust tagav seondumistemperatuur 72 °C (vt joonis 7a-7b). Minimaalne detekteeritav DNA kontsentratsioon jäi erinevate *Armillaria* liikide DNA-d kasutades vahemikku 13,8 – 42,8 fg/µl (vt joonis 8). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 72 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite *Armillaria* spetsiifilisust kontrolliti esmalt *in silico* võrreldes *Armillaria* ITS1 ja ITS2 järjestusi NCBI *blastn* programmi abil leitud *Armillaria* ITS järjestustele sarnaste järjestustega. Katseliselt kontrolliti praimerite spetsiifilisust kasutades kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 9) ja järgnevate liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Xerula radicata*, *Flammulina velutipes*, *Fusarium sporotrichoides*. Spetsiifilisuse kontrollimisel andsid positiivse tulemuse neli mullast eraldatud DNA proovi ning kõigil juhtudel vastas geelelektroforeesil visualiseeritud DNA fragmentide suurus perekonna *Armillaria* liikide puhul eeldatavale amplokoni suurusele (vt joonis 10).

Joonis 6



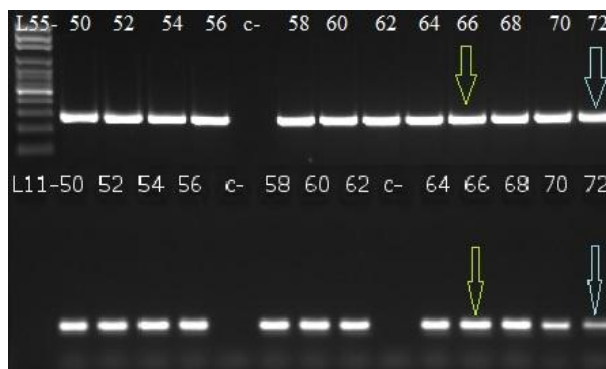
Test nakatunud substraadil
L1 – *A. ostoyae* puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi DNA
c- – negatiivne kontroll

Joonis 7a



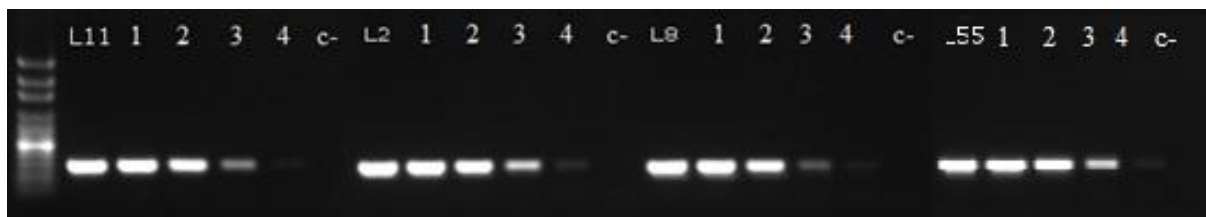
Seondumistemperatuuride (At) analüüs
 L2 – *A. ostoyae*
 L8 – *A. borealis*
 50-72 – At (°C)
 c- – negatiivne kontroll
 roheline nool – optimaalne At
 sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 7b



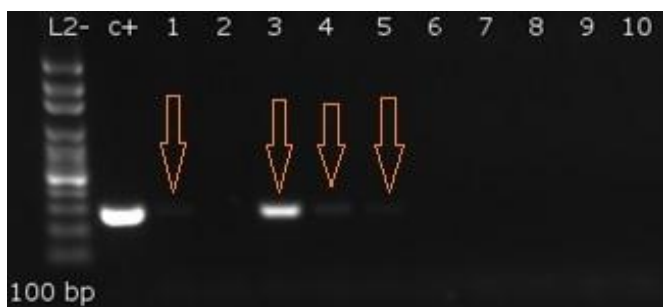
Seondumistemperatuuride (At) analüüs
 L55 – *A. gallica*
 L11 – *A. cepistipes*
 50-72 – At (°C)
 c- – negatiivne kontroll
 roheline nool – optimaalne At
 sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 8



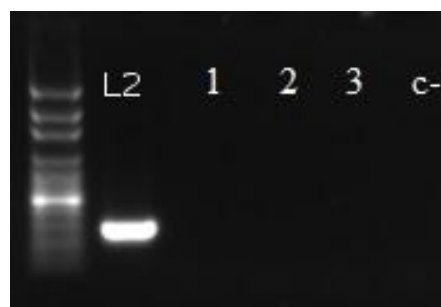
Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
 L11 – *A. cepistipes* algne kontsentratsioon (138 pg/μl); L2 – *A. ostoyae* algne kontsentratsioon (240 pg/μl)
 L8 – *A. borealis* algne kontsentratsioon (428 pg/μl); L55 – *A. gallica* algne kontsentratsioon (254 pg/μl)
 1-4 – 10x lahjenduste seeria; c- – negatiivne kontroll

Joonis 9



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*A. ostoyae* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA
 punased nooled – positiivsed proovid

Joonis 10



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L2 – *A. ostoyae* puhaskultuuri DNA
 1 – *X. radicata* puhaskultuuri DNA
 2 – *F. velutipes* puhaskultuuri DNA
 3 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

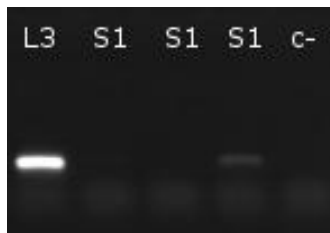
Perekonna *Fusarium* spetsiifilised PCR praimerid

Perekonna *Fusarium* spetsiifiliste praimerite disainimisel võeti aluseks järgmisete liikide ITS1 ning ITS2 regioonide järjestused – *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*. Päripidise praimer (Fusa-F) seundumissait asub ITS1 regioonis ning ligikaudu 110 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimer (Fusa-R) seundumissait ITS2 regioonis ning ligikaudu 53 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

Fusa-F ja Fusa-R praimerid on 22 nukleotiidi pikad ning praimerite GC sisaldus on 36% ja 41%. Praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 60 °C ja 62 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 51 °C ja 53 °C. Praimeritega amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on ligikaudu 297 bp. Päripidise praimer puhul on stabiilseima võimaliku nõelasilma struktuuri ja homodimeeri delta G väärtused -0,74 kcal/mol ja -3,52 kcal/mol. Äraspidise praimer puhul on antud suurused -0,8 kcal/mol ja -3,61 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -3,9 kcal/mol.

Praimerite sobivust perekonna *Fusarium* liikide tuvastamiseks bioloogilistest proovidest kontrolliti kasutades järgmistest puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *F. sporotrichoides*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* (vt joonis 11). *Fusarium* tuvastamine õnnestus ka nakatunud arukase (*Betula pendula*) ja halli lepa (*Alnus incana*) võrsetest. Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 50 °C ja kõrgeimat spetsiifilisust tagav seondumistemperatuur 52 °C (vt joonis 12a-12b). Suhteliselt madal seondumistemperatuur tuleneb praimerite 5' otstes sisalduvatest mitte-komplimentaarsetest positsioonidest, mis on vajalikud tagamaks võimalikult efektiivset seondumist erinevate perekonna *Fusarium* liikide sihtmärk järjestustega. Minimaalne detekteeritav DNA kontsentratsioon jäi erinevate liikide DNA-d kasutades vahemikku 0,42 – 1,42 pg/μl (vt joonis 13). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 52 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite spetsiifilisust kontrolliti *in silico* võrreldes praimerite järjestusi teiste liikide vastavate järjestustega ja eksperimentaalselt kasutades kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d ja järgmistest puhaskultuuridest puhastatud DNA-d – *Neonectria fuckeliana*, *Neonectria radicicola*, *Armillaria borealis* (vt joonis 14). Nelja mullaproovi DNA andis testimisel positiivse tulemuse ning geelelektroforeesil visualiseeritud DNA fragmentide pikkused vastasid seejuures perekonna *Fusarium* liikide puhul eeldatavale amplikoni suurusele (vt joonis 15).

Joonis 11



Test nakatunud substraadil

L1 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA

S1 – nakatunud substraadi DNA

c- – negatiivne kontroll

Joonis 12a



Seondumistemperatuuride (At) analüüs

L3 – *F. sporotrichoides*

L8 – *F. avenaceum*

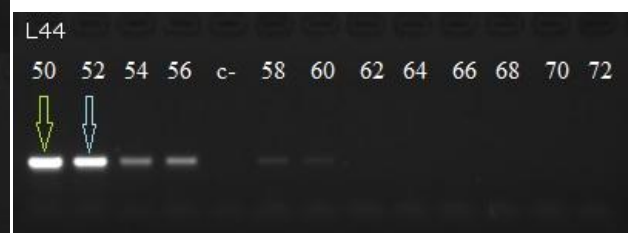
50-72 – At (°C)

c- – negatiivne kontroll

roheline nool – optimaalne At

sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 12b



Seondumistemperatuuride (At) analüüs

L44 – *F. culmorum*

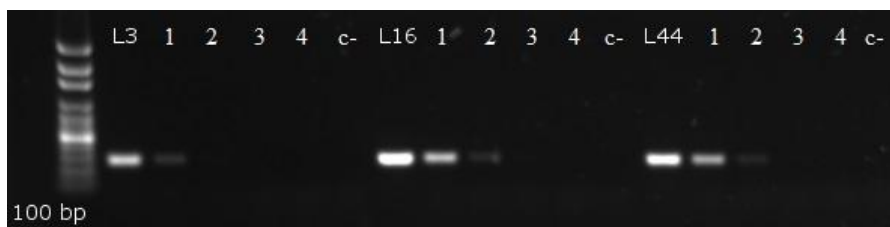
50-72 – At (°C)

c- – negatiivne kontroll

roheline nool – optimaalne At

sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 13

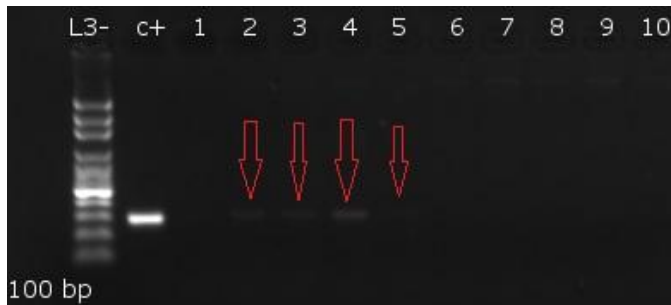


Sensitiivsuse test DNA lahjendustel

L3 – *F. sporotrichoides* algne kontsentratsioon (99 pg/μl); L16 – *F. avenaceum* algne kontsentratsioon (42 pg/μl); L44 – *F. culmorum* algne kontsentratsioon (142 pg/μl);

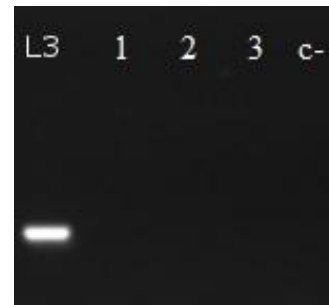
1-4 – 10x lahjenduste seeria; c- – negatiivne kontroll

Joonis 15



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA
 punased nooled – positiivsed proovid

Joonis 14



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L2 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA
 1 – *N. fuckeliana* puhaskultuuri DNA
 2 – *N. radicola* puhaskultuuri DNA
 3 – *A. borealis* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

***Diplodia sapinea* spetsiifilised PCR praimerid**

Diplodia sapinea spetsiifiline praimeripaar disainiti mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku DNA (mtSSU rDNA) järjestuse põhjal. Praimeripaari liigispetsiifilisuse tagab päripidine praimer DiSapi-F, äraspidine praimer Diplo-R ei ole liigispetsiifiline ning on kasutatav ka *Diplodia scrobiculata* spetsiifilises praimeripaaris (vt tabel 5). Päripidine praimer DiSapi-F on sarnane Stanosz et al. 2006 kirjeldatud liigispetsiifilisele praimerile.

DiSapi-F ja Diplo-R on 26 ja 21 nukleotiidi pikad ning praimeritega amplifitseeritava DNA produkti pikkus on 546 bp. Praimerite GC nukleotiidide sisaldused on vastavalt 31% ja 43% ning arvutuslikud denatureerumistemperatuurid on Marmur'i valemi järgi 70 °C ja 60 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 51 °C ja 52 °C. Stabiilseima võimaliku juuksenõela struktuuri delta G väärtus on DiSapi-F puhul -0,53 kcal/mol ja Diplo-R puhul -0,83 kcal/mol. Praimerite homodimeeride minimaalsed delta G väärtused on vastavalt -6,35 kcal/mol ja -4,67 kcal/mol. Erinevate praimerite heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -5,99 kcal/mol.

Praimerite efektiivsus *D. sapinea* DNA detekteerimisel tõestati kasutades *D. sapinea* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ja seenega nakatunud hariliku männi (*Pinus sylvestris*) okastest eraldatud DNA-d (vt joonis 16). Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 58 °C ja kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur 61 °C (vt joonis 17). Madalaim DNA kontsentratsioon, mida õnnestus praimeritega detekteerida, oli 2,4 pg/μl

(vt joonis 18). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 61 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimeripaari spetsiifilisust kontrolliti esmalt *in silico* võrreldes praimerite järjestusi *Diplodia scrobiculata* ja teiste liikide sarnaste DNA järjestustega (vt joonis 19). Spetsiifilisuse eksperimentaalsel kontrollimisel kasutati PCR reaktsioonis kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 20) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d - *Diplodia scrobiculata*, *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata* (vt joonis 21). Kõik spetsiifilisuse testimisel kasutatud DNA proovid andsid kontrollimisel negatiivse tulemuse, mis kinnitab praimerite spetsiifilisust.

Joonis 16



Test nakatunud substraadil
L15 – *D. sapinea* puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 17



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 18



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L15 – *D. sapinea* algne kontsentratsioon (24 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

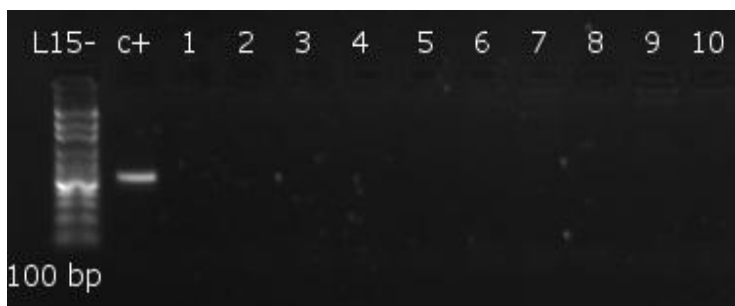
Joonis 19

D. sapinea (forward) - 5' CCCTTATATATCAAACATGCTTTGT 3'
D. scrobiculata - 5' CCCTTATATATCAAACATGTTTGC 3'
D. seriata - 5' CCCTTATAAATCAATCTAAGCTTTGT 3'

D. sapinea (reverse) - 5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'
D. scrobiculata - 5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'
D. seriata - 5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'

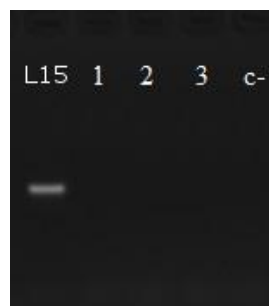
In silico spetsiifilisuse kontroll
D. scrobiculata – accession nr AF051637
D. seriata – accession nr AF051639

Joonis 20



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*D. sapinea* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 21



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
L15 – *D. sapinea* puhaskultuuri DNA
1 – *D. scrobiculata* puhaskultuuri DNA
2 – *D. mutila* puhaskultuuri DNA
3 – *D. seriata* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

***Diplodia scrobiculata* spetsiifilised PCR praimerid**

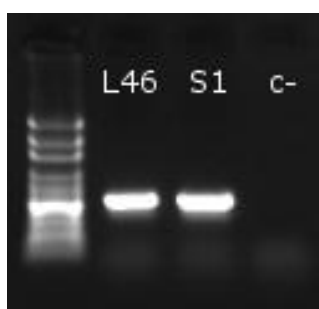
Diplodia scrobiculata spetsiifilise praimeripaari disainimisel võeti aluseks mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku DNA (mtSSU rDNA) järjestus. Praimeripaari liigispetsiifilisuse tagab päripidine praimer DiScro-F, äraspidine praimer Diplo-R ei ole liigispetsiifiline ning on kasutatav ka *Diplodia sapinea* spetsiifilises praimeripaaris (vt tabel 5). Päripidine praimer DiScro-F on sarnane Stanosz et al. 2006 kirjeldatud liigispetsiifilisele praimerile.

Praimerite DiScro-F ja Diplo-R pikkused on 28 ja 21 nukleotiidi ning praimeritega amplifitseeritav DNA lõik on 547 bp pikk. DiScro-F GC nukleotiidide sisaldus on 29% ja Diplo-R GC sisaldus 43%. Praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 72 °C ja 60 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi mõlemal praimeril 52 °C. Stabiilseima võimaliku juuksenõela struktuuri delta G väärtus on DiScro-F puhul -2,97 kcal/mol ja Diplo-R puhul -0,83 kcal/mol. Praimerite homodimeeride minimaalsed delta G väärtused on vastavalt -7,18 kcal/mol ja -4,67 kcal/mol. Erinevate praimerite heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -5,09 kcal/mol.

D. scrobiculata spetsiifiliste praimerite funktsionaalsust sihtmärgiks oleva DNA detekteerimisel testiti kasutades *D. scrobiculata* puhaskultuurist ja nakatunud substraadist eraldatud DNA-d. Mõlemal juhul *D. scrobiculata* tuvastamine proovidest õnnestus (vt joonis 22). Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur ning ühtlasi

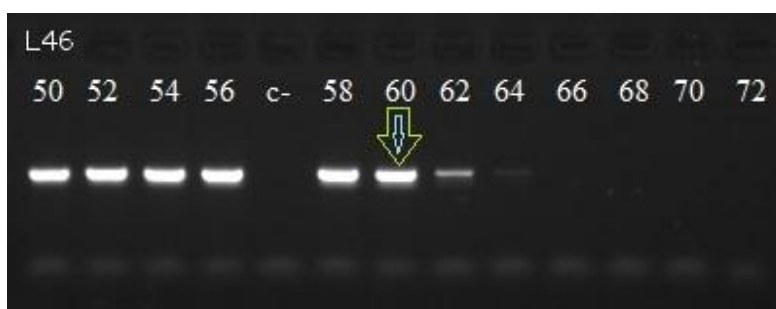
ka kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur on 60 °C (vt joonis 23). Madalaim detekteeritav DNA kontsentratsioon oli spetsiifilisi praimereid kasutades 1,52 pg/μl (vt joonis 24). Praimerite funktsionaalsust ning sensitiivsust testiti seondumistemperatuuril 60 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Spetsiifilisuse tagamiseks võrreldi disainitavate praimerite nukleotiidseid järjestusi *in silico* *Diplodia sapinea* ja teiste liikide sarnaste järjestustega (vt joonis 25) ning testiti praimereid kasutades PCR reaktsioonis kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 26) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d - *Diplodia sapinea*, *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata* (vt joonis 27). Kõik spetsiifilisuse kontrollimisel kasutatud DNA proovid andsid testimisel negatiivse tulemuse.

Joonis 22



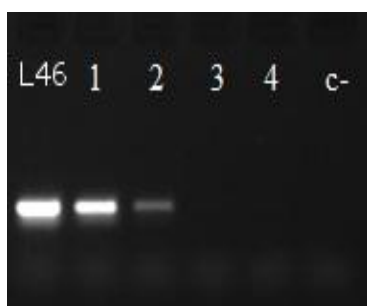
Test nakatunud substraadil
L46 – *D. scrobiculata*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 23



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 24



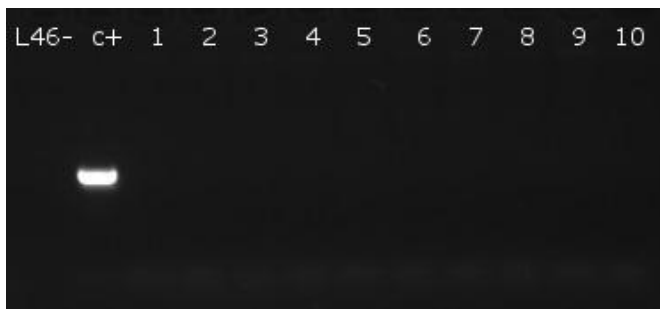
Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L46 – *D. scrobiculata* algne
kontsentratsioon (152 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 25

D. scrobiculata (forward) - 5' CCCTTATATATCAAACCTAATGTTTGCAT 3'
D. sapinea - 5' CCCTTATATATCAAACCTATGCTTTGTAT 3'
D. seriata - 5' CCCTTATAAATCAATCTAAGCTTTGTAT 3'
D. scrobiculata (reverse) - 5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'
D. sapinea - 5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'
D. seriata - 5' TTACATAGAGGATTGCCTTCG 3'

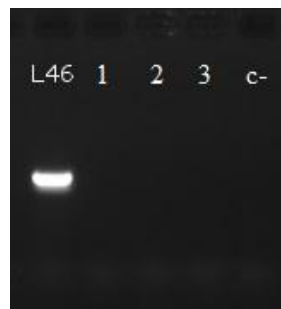
In silico spetsiifilisuse kontroll
D. sapinea – accession nr AF051636
D. seriata – accession nr AF051639

Joonis 26



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*D. scrobiculata* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 27



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L46 – *D. scrobiculata* puhaskultuuri DNA
 1 – *D. sapinea* puhaskultuuri DNA
 2 – *D. mutila* puhaskultuuri DNA
 3 – *D. seriata* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

***Dothistroma pini* spetsiifilised PCR praimerid**

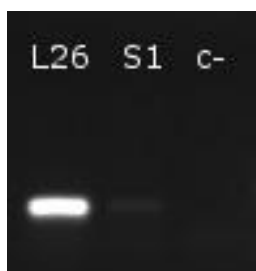
Dothistroma pini spetsiifilised PCR praimerid disainiti ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimerid (DoPini-F) seondumissait paikneb ITS1 regioonis 95 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ning äraspidise praimerid (DoPini-R) seondumissait asub ITS2 regioonis 113 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

Disainitud liigispetsiifiliste praimerite pikkused on 23 (DoPini-F) ja 18 (DoPini-R) nukleotiidi ning praimerite GC sisaldus on 44% DoPini-F puhul ning 50% DoPini-R puhul. Arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 66 °C ja 54 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 54 °C mõlema praimerid jaoks. Praimeritega amplifitseeritava produkti pikkus on 239 bp. Praimerid DoPini-F poolt moodustatava stabiilseima juuksenõela struktuuri delta G väärtus on 0,3 kcal/mol ning stabiilseima homodimeeri puhul on delta G väärtus -7,05 kcal/mol. Praimerid DoPini-R puhul on vastavad väärtused 0,21 kcal/mol ja -6,34 kcal/mol. Kahe praimerid heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -4,41 kcal/mol.

DoPini-F ja DoPini-R praimereid kasutades õnnestus *Dothistroma pini* detekteerimine nii *D. pini* puhaskultuurist eraldatud DNA-st, kui nakatunud musta männi (*Pinus nigra*) okastest eraldatud DNA-st (vt joonis 28). Eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 58 °C ning maksimaalne efektiivne seondumistemperatuur 66 °C

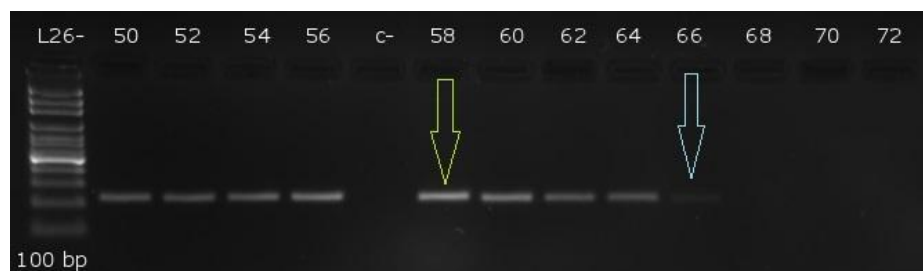
(vt joonis 29). Minimaalne detekteeritav DNA kontsentratsioon oli 0,768 pg/μl (vt joonis 30). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seandumistemperatuuril 66 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite liigspetsiifilisust kontrolliti *in silico* võrreldes praimerite järjestusi geenipangas olevate sarnaste järjestustega, et tagada ka lähedaste liikide nagu *Mycosphaerella dearnessii* ja *Mycosphaerella pini* diskrimineerimine PCR reaktsioonil (vt joonis 31). Liigspetsiifilisust testiti ka eksperimentaalselt kasutades kümnest mullaproovist puhastatud DNA-d (vt joonis 32) ja järgmistest puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Mycosphaerella pini*, *Mycosphaerella dearnessii*, *Mycosphaerella microspora* (vt joonis 33). Kõik spetsiifilisuse testimisel kasutatud DNA proovid andsid testimisel negatiivse tulemuse.

Joonis 28



Test nakatunud substraadil
L26 – *D. pini* puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 29



Seandumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 30



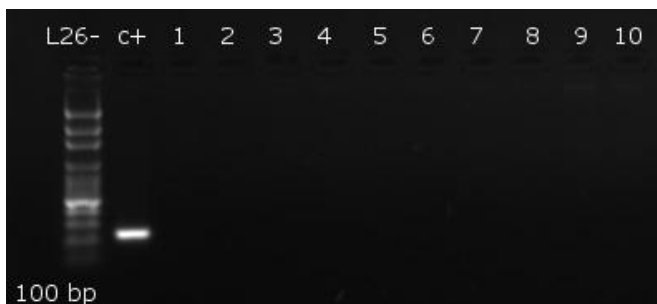
Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L26 – *D. pini* algne kontsentratsioon (768 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 31

<i>D. pini</i> (forward) - 5' GGTCATCAAACACTGCATCTATG 3'
<i>M. pini</i> - 5' GGTCATCAAACACTGCATCTTTG 3'
<i>M. dearnessii</i> - 5' ATCTATCAAACACTGCATTACCT 3'
<i>D. pini</i> (reverse) - 5' ACGCCCAATACCAAGCTA 3'
<i>M. pini</i> - 5' ACGCCCAATACCAAGCCA 3'
<i>M. dearnessii</i> - 5' ACGCCCAATACCAAGCCA 3'

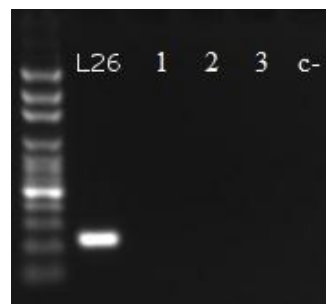
In silico spetsiifilisuse kontroll
M. pini – accession nr KC995004
M. dearnessii – accession nr JQ388472

Joonis 32



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*D. pini* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 33



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhas-
kultuuridest eraldatud DNA proovidel
L26 – *D. pini* puhaskultuuri DNA
1 – *M. pini* puhaskultuuri DNA
2 – *M. dearnessii* puhaskultuuri DNA
3 – *M. microspora* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

***Gremmeniella abietina* spetsiifilised PCR praimerid**

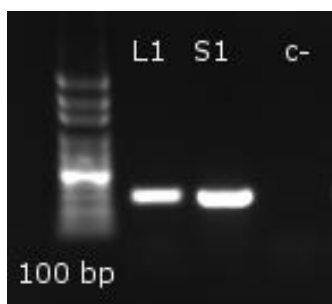
ITS regiooni järjestusi teiste NCBI andmebaasis olevate ning märkimisväärselt sarnasust omavate järjestustega võrreldes leiti kaks spetsiifiliste praimerite disainimiseks sobivat piirkonda. Pärripidise praimeri (GrAbi-F) seondumissait paikneb ITS1 regioonis 88 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimeri (GrAbi-R) seondumissait paikneb ITS2 regioonis 31 bp kaugusel ribosoomi 28S geeni algusest (vt tabel 5).

Praimerite pikkus on 18 nukleotiidi ja GC nukleotiidide sisaldused vastavalt 61% ja 66%. Disainitud praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 58 °C ja 60 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 55 °C ja 57 °C. PCR produkti eeldatav pikkus GrAbi-F ja GrAbi-R praimereid kasutades on 323 bp. GrAbi-F moodustatava stabiilseima nõelasilma struktuuri ja homodimeeri delta G väärtused on vastavalt -0,68 kcal/mol ja -4,67 kcal/mol. GrAbi-R puhul on vastavad näitajad 0,35 kcal/mol ja -3,61 kcal/mol. GrAbi-F ja GrAbi-R heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -6,24 kcal/mol.

Praimerite toimimist sihtmärgiks oleva DNA peal kontrolliti kasutades PCR reaktsioonis *G. abietina* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ning seenega nakatunud substraadist eraldatud DNA-d (vt joonis 34). Praimerite optimaalseim seondumistemperatuur on 60 °C ning kõrgeimat spetsiifilisust võimaldav seondumistemperatuur 64 °C (vt joonis 35).

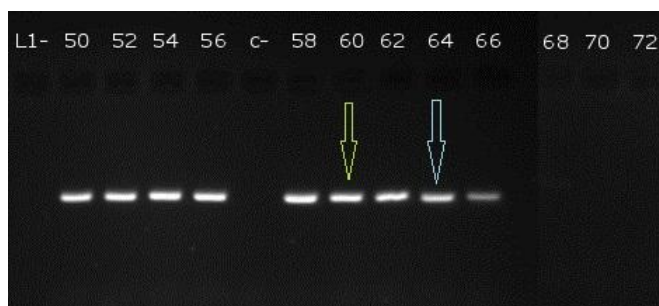
Minimaalne detekteeritav DNA kontsentratsioon oli 54,2 pg/μl (vt joonis 36). Praimerite toimimist ja tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 64 °C ning viies läbi 35 PCR tsüklit (1x (95 °C 15 min), 35x (95 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min), 1x (72 °C 10 min)). *In silico* spetsiifilisuse analüüsi põhjal võimaldavad liigispetsiifilised praimerid ka samasse perekonda kuuluvate *G. abietina* var. *balsamea* ja *G. laricina* diskrimineerimist (vt joonis 37). Praimerite spetsiifilisust kontrolliti katseliselt kasutades kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 38) ning järgmistest puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Sirococcus conigenus*, *Fusarium sporotrichoides*, *Armillaria borealis* (vt joonis 39). Ükski spetsiifilisuse kontrollimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud PCR reaktsioonil tuvastatavat produkti.

Joonis 34



Test nakatunud substraadil
L1 – *G. abietina* puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi DNA
c- – negatiivne kontroll

Joonis 35



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeimat spetsiifilisust tagav At

Joonis 36



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L1 – algne kontsentratsioon (542 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 37

<i>G. abietina</i> (forward) - 5'	GGAGGACCCCAACCTATG 3'
<i>G. abietina</i> var. <i>balsamea</i> - 5'	AGAGGACCCCAACTCATG 3'
<i>G. laricina</i> - 5'	AGAGGACCT - AACTCATG 3'
<i>G. abietina</i> (reverse) - 5'	GTCTCCCGAGCCCTGTAG 3'
<i>G. abietina</i> var. <i>balsamea</i> - 5'	GTCTCCCGGCCCTATAG 3'
<i>G. laricina</i> - 5'	GTCTGCCGAGCCCTATAG 3'

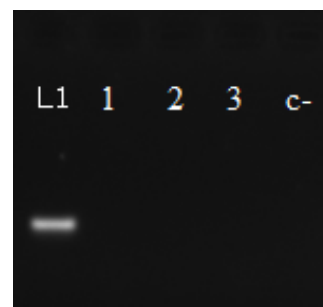
In silico spetsiifilisuse kontroll
G. abietina var. *balsamea* – accession nr JN131826
G. laricina – accession nr JN131832

Joonis 38



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*G. abietina* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 39



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
L1 – *G. abietina* puhaskultuuri DNA
1 – *S. conigenus* puhaskultuuri DNA
2 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA
3 – *A. borealis* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

***Herpotrichia juniperi* spetsiifilised PCR praimerid**

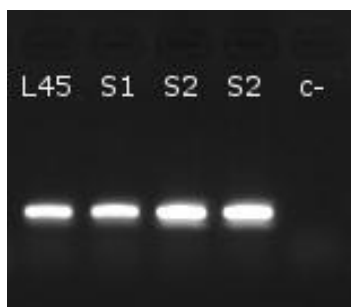
Herpotrichia juniperi spetsiifiline päripidine (HeJuni-F) ja äraspidine (HeJuni-R) praimer disainiti tuumse ribosoomi suure subühiku DNA (LSU rDNA) järjestuse põhjal (vt tabel 5).

HeJuni-F pikkus on 18 nukleotiidi ja HeJuni-R pikkus 24 nukleotiidi. Praimeritega amplifitseeritava PCR produkti pikkus on 306 bp. GC nukleotiidide sisaldused on päripidistel ja äraspidistel praimeritel vastavalt 61% ja 50% ning arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) Marmur'i valemi järgi 58 °C ja 72 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 59 °C ja 58 °C. HeJuni-F moodustatava stabiilseima võimaliku nõelasilma struktuuri delta G väärtus on -1,44 kcal/mol ja stabiilseima homodimeeri delta G väärtus -4,74 kcal/mol. HeJuni-R puhul on vastavad delta G väärtused 0,36 kcal/mol ja -3,14 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri minimaalne delta G väärtus on -5,02 kcal/mol.

Praimerite kasutatavust *H. juniperi* DNA tuvastamisel erinevatest bioloogilistest proovidest testiti edukalt kasutades nii *H. juniperi* puhaskultuurist eraldatud DNA-d kui seenega nakatunud hariliku kuuse (*Picea abies*) okastest eraldatud DNA-d (vt joonis 40). Eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur ja kõrgeim efektiivne

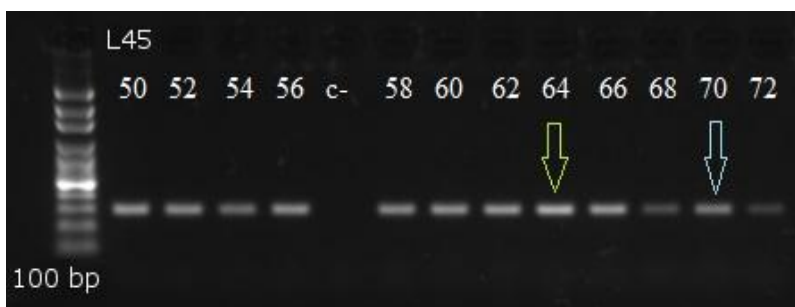
seondumistemperatuur on antud praimerite puhul 64 °C ja 70 °C (vt *joonis 40a*). Minimaalne DNA kontsentratsioon, mida õnnestus reaktsioonisegust detekteerida, oli 19,2 fg/μl (vt *joonis 40b*). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 70 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Disainimisel kontrolliti praimerite spetsiifilisust *in silico* võrreldes praimerite nukleotiidseid järjestusi teiste geenipangas olevate järjestustega, et tagada ka lähedaste liikide, näiteks *Lophiostoma macrostomum* ja *Trematosphaeria pertusa* diskrimineerimine PCR reaktsioonis (vt *joonis 41*). *In silico* analüüsi põhjal ei diskrimineeri praimerid peamiselt kaheidulehelistelt rohttaimedelt leitud seeneliiki *Wettsteinina pachyasca* (Scheuer 2000). Eksperimentaalselt kontrolliti praimerite spetsiifilisust kasutades kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt *joonis 42*) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Herpotrichia parasitica*, *Armillaria ostoyae*, *Diplodia sapinea* (vt *joonis 43*). Mitte ükski spetsiifilisuse kontrollimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud testimisel positiivset tulemust.

Joonis 40



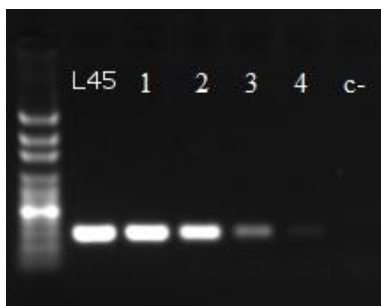
Test nakatunud substraadil
L45 – *H. juniperi*
puhaskultuuri DNA
S1, S2 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 40a



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 40b



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L45 – *H. juniperi* algne kontsentratsioon
(192 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 41

<i>H. juniperi</i> (forward) - 5' GCTTTGGTGTCTGGCAGCA 3'
<i>L. macrostomum</i> - 5' GCTTTGGAGTCGGCAGCA 3'
<i>T. pertusa</i> - 5' GCTTTGGTGTCTGGCAGCG 3'
<i>H. juniperi</i> (reverse) - 5' GGAAAACCCCAGATGAGCAACTAC 3'
<i>L. macrostomum</i> - 5' GGAAATCCCCAGATGAGCAACTGC 3'
<i>T. pertusa</i> - 5' GGAAATCCCCAGATGAGCAACTAC 3'

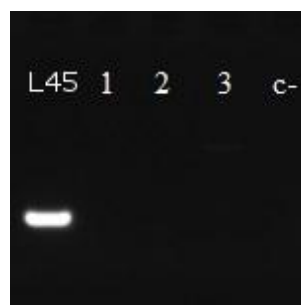
In silico spetsiifilisuse kontroll
L. macrostomum – accession nr DQ384094
T. pertusa – accession nr DQ678072

Joonis 42



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*H. juniperi* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 43



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest
puhaskultuuridest eraldatud DNA
proovidel
L45 – *H. juniperi* puhaskultuuri DNA
1 – *H. parasitica* puhaskultuuri DNA
2 – *A. ostoyae* puhaskultuuri DNA
3 – *D. sapinea* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

***Heterobasidion annosum* spetsiifilised PCR praimerid**

Heterobasidion annosum spetsiifilised PCR praimerid disainiti ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimerid (HetAn-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 90 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimerid (HetAn-R) seondumissait paikneb ITS2 regioonis 44 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

Päripidised ja äraspidised praimerid on vastavalt 19 ja 18 nukleotiidi pikad ning praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 58 °C ja 56 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 55 °C mõlema praimeriga. HetAn-F GC sisaldus on 53% ning HetAn-R GC sisaldus 56%. Praimeritega amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on 416 bp. HetAn-F stabiilseima võimaliku juuksenoela struktuuri delta G väärtus on -0,08 kcal/mol ning stabiilseima homodimeeri delta G väärtus -3,61 kcal/mol. HetAn-R puhul on nimetatud sekundaarstruktuuride delta G väärtused -0,92 kcal/mol ja -5,02 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri delta G minimaalne väärtus on -4,41 kcal/mol.

H. annosum detekteerimine õnnestus HetAn-F ja HetAn-R praimereid kasutades nii puhaskultuurist eraldatud DNA-st kui ka nakatunud hariliku männi (*Pinus sylvestris*) puidust eraldatud DNA proovist (vt joonis 44). Praimeripaari eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 64 °C ning kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur 66 °C (vt joonis 45). Minimaalne praimeritega detekteeritud DNA kontsentratsioon oli 3,7 pg/μl (vt joonis 46). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 66 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite spetsiifilisust kontrolliti esmalt *in silico* kontrollides praimerite nukleotiidses järjestuses sarnasust geenipangas olevate DNA järjestustega, et tagada ka sama perekonna teiste liikide, näiteks *H. abietinum* ja *H. parviporum* diskrimineerimine (vt joonis 47). Eksperimentaalselt kontrolliti praimerite spetsiifilisust kasutades PCR reaktsioonis *H. abietinum*, *H. parviporum* ja *Fusarium sporotrichoides* puhaskultuuridest eraldatud DNA-d (vt joonis 48) ning kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 49). Mitte üksi spetsiifilisuse testimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud positiivset tulemust, mis tõestab praimerite liigispetsiifilisust.

Joonis 44



Test nakatunud substraadil
L58 – *H. annosum* puhaskultuuri DNA
S1, S2 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 45



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 46



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L58 – *H. annosum* algne
kontsentratsioon (37 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 47

H. annosum (forward) - 5' TCGGTCGGGTCTTTTGAC 3'
H. parviporum - 5' TCGGTCGGGCTCTTTT**TTG** 3'
H. abietinum - 5' TCGGTCGGGCTCTTTT**TTG** 3'
H. annosum (reverse) - 5' CACAATCGTGGCGTACCA 3'
H. parviporum - 5' CACAATCG**CGGTGTACCC** 3'
H. abietinum - 5' CACAATCG**CGGTGTACCC** 3'

In silico spetsiifilisuse kontroll
H. parviporum – accession nr KC492950
H. abietinum – accession nr KC492898

Joonis 49



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*H. annosum* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 48



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
L58 – *H. annosum* puhaskultuuri DNA
1 – *H. parviporum* puhaskultuuri DNA
2 – *H. abietinum* puhaskultuuri DNA
3 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

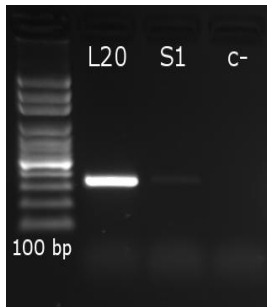
Hymenoscyphus albidus spetsiifilised PCR praimerid

Hymenoscyphus albidus spetsiifilised PCR praimerid disainit sama liigi ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimerid (HALbi-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 93 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimerid (HALbi-R) seondumissait ITS2 regioonis 16 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

Praimerite HALbi-F ja HALbi-R pikkus on 20 nukleotiidi ja praimeritega amplifitseeritava DNA produkti pikkus on 356 bp. *H. albidus* spetsiifiliste praimerite GC nukleotiidide sisaldused on 60% päripidise praimeri puhul ja 55% äraspidise praimeri puhul. Praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid on Marmur'i valemi järgi 64 °C ja 62 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 59 °C ja 56 °C. HALbi-F moodustatava stabiilseima nõelasilma struktuuri delta G väärtus on -1,75 kcal/mol ja stabiilseima homodimeeri delta G väärtus -4,67 kcal/mol. HALbi-R jaoks on vastavad delta G väärtused -1,34 kcal/mol ja -4,41 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -8,16 kcal/mol.

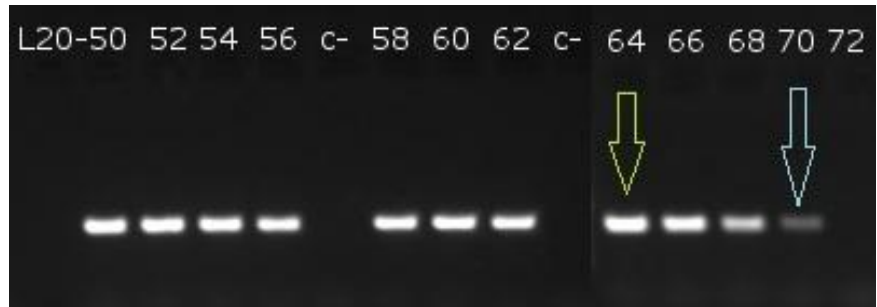
Praimerite efektiivsust sihmärgiks oleva *H. albidus* DNA lõigu amplifitseerimisel kontrolliti kasutades PCR reaktsioonis *H. albidus* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ja *H. albidus* poolt koloniseeritud hariliku saare (*Fraxinus excelsior*) võrsetest eraldatud DNA-d ning sihtmärgiks oleva DNA tuvastamine õnnestus mõlemal juhul (vt joonis 50). Katseliselt määrati liigispetsiifiliste praimerite optimaalseks seondusmitemperatuuriks 64 °C ja kõrgeimaks efektiivseks seondumistemperatuuriks 70 °C (vt joonis 51). Minimaalne detekteeritav DNA kogus oli 19,7 fg reaktsioonisegu kohta (vt joonis 52). Praimerite funktsionaalsust ning sensitiivsust testiti seondumistemperatuuril 70 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite disainimisel kontrolliti nende spetsiifilisust *in silico* võrreldes praimerite nukleotiidseid järjestusi teiste geenipangas olevate sarnaste järjestustega, et tagada ka väga lähedaste liikide (näiteks patogeenne *H. pseudoalbidus*) diskrimineerimine PCR reaktsioonis (vt joonis 53). Halbi-F ja Halbi-R spetsiifilisust testiti ka eksperimentaalselt kasutades kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 54) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Fusarium sporotrichoides*, *Armillaria ostoyae* (vt joonis 55). Mitte ükski spetsiifilisuse testimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud positiivset tulemust.

Joonis 50



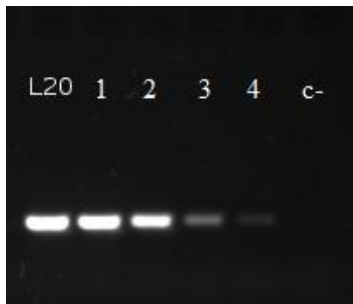
Test nakatunud substraadil
L20 – *H. albidus*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 51



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 52



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L20 – *H. albidus* algne
kontsentratsioon (197 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 53

H. albidus (forward) - 5' GACCGTGCCTGCTAGAGGAT 3'
H. pseudoalbidus - 5' GACTGTGCCTGCTAGAGGAC 3'
H. fructigenus - 5' GATCGTGCCTGCCAGAGAAC 3'
H. albidus (reverse) - 5' GGTTTCTGGCAAGACACCTC 3'
H. pseudoalbidus - 5' GGTTGCTGGCAAGACACCGC 3'
H. fructigenus - 5' GGTTGCTGGCAAGACACCCT 3'

In silico spetsiifilisuse kontroll
H. pseudoalbidus – accession nr KF188729
H. fructigenus – accession nr KC481690

Joonis 54



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*H. albidus* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 55



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest
puhaskultuuridest eraldatud DNA
proovidel
L20 – *H. albidus* puhaskultuuri DNA
1 – *H. pseudoalbidus* puhaskultuuri DNA
2 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA
3 – *A. ostoyae* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

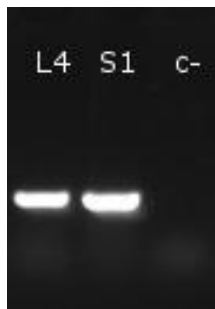
***Hymenoscyphus pseudoalbidus* spetsiifilised PCR praimerid**

Hymenoscyphus pseudoalbidus spetsiifiliste PCR praimerite disainimisel võeti aluseks ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestused. Päripidise praimer (HyPse-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 56 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimer (HyPse-R) seondumissait ITS2 regioonis 19 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

HyPse-F ja HyPse-R on 19 nukleotiidi pikad ning amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on 389 bp. GC nukleotiidide sisaldus on nii päripidistes kui äraspidistes praimerites 58% ja arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi mõlema praimer puhul 56 °C ja IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi vastavalt 57 °C ja 61 °C. Võimalike nõelasilma struktuuride ja homodimeeride stabiilseimate vormide delta G väärtused on HyPse-F puhul vastavalt -0,65 kcal/mol ja -4,67 kcal/mol ning HyPse-R puhul -0,35 kcal/mol ja -5,09 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri minimaalne delta G väärtus on -6,69 kcal/mol.

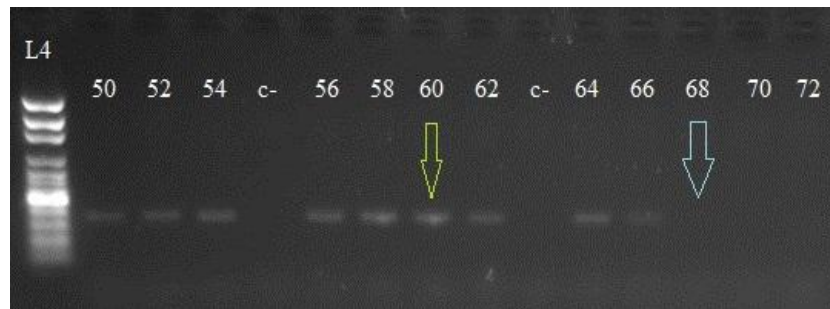
Praimerite kasutatavust *H. pseudoalbidus* DNA tuvastamiseks erinevatest bioloogilistest proovidest testiti edukalt kasutades PCR reaktsioonis *H. pseudoalbidus* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ja nakatunud hariliku saare (*Fraxinus excelsior*) võrsetest eraldatud DNA-d (vt joonis 56). Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 60 °C ja kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur 68 °C (vt joonis 57). Minimaalne detekteeritav DNA kontsentratsioon oli HyPse-F ja HyPse-R praimereid kasutades 1,21 pg/μl (vt joonis 58). Praimerite funktsionaalsust ning sensitiivsust testiti seondumistemperatuuril 68 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite liigispetsiifilisust testiti esmalt *in silico* võrreldes praimerite järjestusi teiste geenipangas olevate järjestustega, pöörates erilist tähelepanu sama perekonna mitte-patogeense liigi, *Hymenoscyphus albidus* eristatavusele (vt joonis 59). Eksperimentaalselt kontrolliti praimerite spetsiifilisust kasutades PCR reaktsiooni kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 60) ning järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Hymenoscyphus albidus*, *Fusarium sporotrichoides*, *Alternaria alternata* (vt joonis 61). Mitte ükski spetsiifilisuse testimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud positiivset tulemust.

Joonis 56



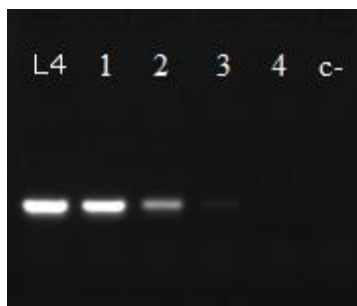
Test nakatunud substraadil
L4 – *H. pseudoalbidus*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 57



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 58



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L4 – *H. pseudoalbidus* algne
kontsentratsioon (1,21 ng/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 59

H. pseudoalbidus (forward) - 5' CTTTAGCAGGTCGCCCTCT 3'
H. albidus - 5' CTTTAGCAGGTCGCCCCCC 3'
H. fructigenus - 5' CTTTGGCAGGCCGCC - TCA 3'
H. pseudoalbidus (reverse) - 5' TGCTGGCAAGACACCGCAA 3'
H. albidus - 5' TTCTGGCAAGACACCTCAA 3'
H. fructigenus - 5' TGCTGGCAAGACACCTAA 3'

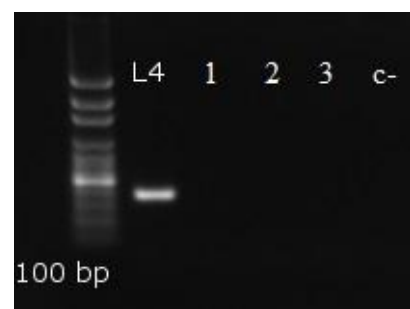
In silico spetsiifilisuse kontroll
H. albidus – accession nr KC481686
H. fructigenus – accession nr KC481690

Joonis 60



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*H. pseudoalbidus* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 61



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest
puhaskultuuridest eraldatud DNA
proovidel
L4 – *H. pseudoalbidus*
puhaskultuuri DNA
1 – *H. albidus* puhaskultuuri DNA
2 – *F. sporotrichoides*
puhaskultuuri DNA
3 – *A. alternata* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

***Lirula macrospora* spetsiifilised PCR praimerid**

Lirula macrospora spetsiifiline päripidine (LiMa-F) ja äraspidine (LiMa-R) praimer disainiti mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku DNA (mtSSU rDNA) järjestuse põhjal (vt tabel 5).

Praimerid LiMa-F ja LiMa-R on 24 ja 20 nukleotiidi pikad ning praimeritega amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on 525 bp. GC nukleotiidide sisaldus on päripidise praimeril 33% ja äraspidisel praimeril 50%. Arvutuslikud denatureerumistemperatuurid on Marmur'i valemi järgi 64 °C ja 60 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 50 °C ja 54 °C. LiMa-F moodustatava stabiilseima nõelasilma struktuuri delta G väärtus on 0,46 kcal/mol ja stabiilseima homodimeeri delta G väärtus -5,38 kcal/mol. LiMa-R vastavad delta G väärtused on -0,35 kcal/mol ja -3,61 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri minimaalne delta G väärtus on -5 kcal/mol.

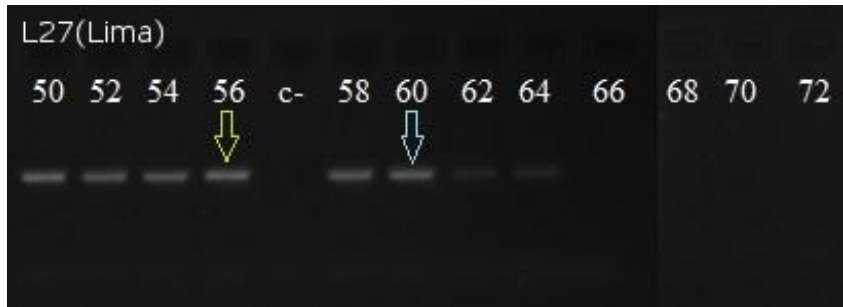
Praimerite funktsionaalsust kontrolliti kasutades nii *L. macrospora* puhaskultuurist kui nakatunud hariliku kuuse (*Picea abies*) okastest eraldatud DNA-d ning mõlemal juhul õnnestus *L. macrospora* DNA detekteerimine proovidest (vt joonis 62). Praimerite katseliselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 56 °C ja kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur 60 °C (vt joonis 63). Minimaalne detekteeritav DNA kogus oli *L. macrospora* spetsiifilisi praimereid kasutades 16,2 fg/µl (vt joonis 64). Praimerite funktsionaalsust ning sensitiivsust testiti seondumistemperatuuril 60 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite liigispetsiifilisust kontrolliti esmalt *in silico* võrreldes praimerite nukleotiidseid järjestusi kõigi geenipangas olevate järjestustega, sealhulgas ka kõige suuremat sarnasust omavate liikidega nagu *Lophodermium piceae* ja *Lophodermium juniperinum* (vt joonis 65). Eksperimentaalselt kontrolliti praimerite spetsiifilisust kasutades PCR reaktsioonis kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 66) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Fusarium sporotrichoides*, *Armillaria borealis*, *Lophodermium pinastri* (vt joonis 67). Kõik spetsiifilisuse testimisel kasutatud DNA proovid andsid negatiivse tulemuse.

Joonis 62



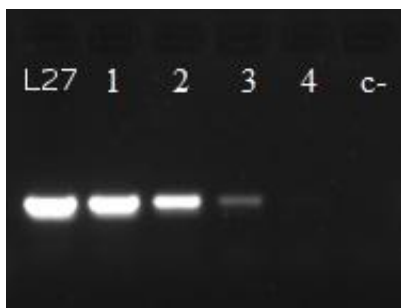
Test nakatunud substraadil
L27 – *L. macrospora*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 63



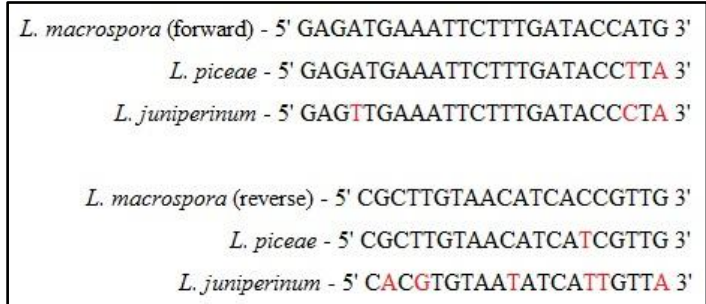
Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 64



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L27 – *L. macrospora* algne
kontsentratsioon (162 pg/PCR)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 65



In silico spetsiifilisuse kontroll
L. piceae – accession nr HM143825
L. juniperinum – accession nr HM143819

Joonis 66



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*L. macrospora* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 67



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest
puhaskultuuridest eraldatud DNA
proovidel
L27 – *L. macrospora* puhaskultuuri DNA
1 – *F. sporotrichoides* puhaskultuuri DNA
2 – *A. borealis* puhaskultuuri DNA
3 – *L. pinastri* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

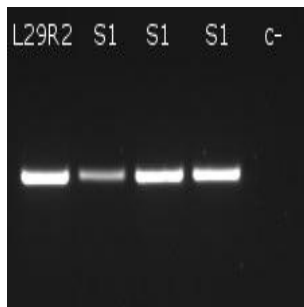
***Lophodermium conigenum* spetsiifilised PCR praimerid**

Lophodermium conigenum spetsiifilised PCR praimerid disainiti ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimerid (LoCon-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 15 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimerid (LoCon-R2) seondumissait ITS2 regioonis 85 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

LoCon-F pikkus on 18 nukleotiidi ja LoCon-R2 pikkus 19 nukleotiidi. Praimerite GC nukleotiidide sisaldused on vastavalt 56% ja 47% ning arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi mõlema praimerid puhul 56 °C ja IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 53 °C ja 54 °C. Amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on liigspetsiifilisi praimereid kasutades 337 bp. LoCon-F poolt moodustatava stabiilseima võimaliku nõelasilma struktuuri delta G väärtus 0,91 kcal/mol ja homodimeeri minimaalne delta G väärtus -3,61 kcal/mol. LoCon-R2 puhul on minimaalsed delta G väärtused vastavalt 1,1 kcal/mol ja -3,61 kcal/mol. Kahe praimerid heterodimeeri minimaalne delta G väärtus on -6,21 kcal/mol.

Praimerite kasutatavust sihtmärgiks oleva liigi detekteerimisel kontrolliti kasutades *L. conigenum* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ja seenega nakatunud hariliku männi (*Pinus sylvestris*) okastest eraldatud DNA-d ning *L. conigenum* tuvastamine õnnestus mõlema juhul (vt joonis 68). Praimerite optimaalseim seondumistemperatuur ja kõrgeimat spetsiifilisust võimaldav seondumistemperatuur määrati katseliselt ning nimetatud temperatuurid on vastavalt 58 °C ja 64 °C (vt joonis 69). Minimaalne detekteeritav DNA kontsentratsioon oli LoCon-F ja LoCon-R2 praimereid kasutades 173 fm/μl (vt joonis 70). Praimerite funktsionaalsust ning sensitiivsust testiti seondumistemperatuuril 64 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Liigspetsiifiliste praimerite spetsiifilisust kontrolliti *in silico* võrreldes praimeriteks valitud järjestusi geenipangas olevate sarnaste järjestustega, et tagada ka sama perekonna teiste liikide diskrimineerimine PCR reaktsioonis (vt joonis 71). Katseliselt testiti spetsiifilisust kasutades kümnest erinevast mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 72) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Lophodermium seditiosum*, *Lophodermium pinastri*, *Lophodermium piceae* (vt joonis 73). Kõik mullaproovidest ja puhaskultuuridest eraldatud DNA proovid andsid spetsiifilisuse testimisel negatiivse tulemuse.

Joonis 68



Test nakatunud substraadil
L29R2 – *L. seditiosum*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 69



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 70



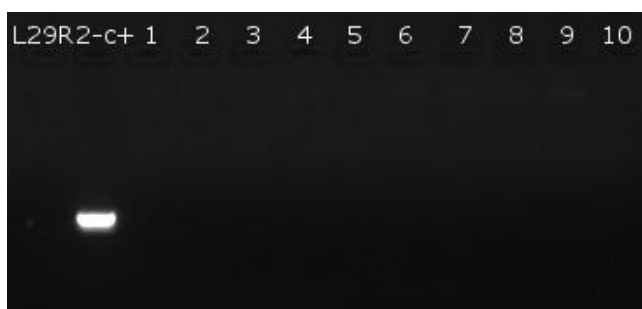
Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L14 – *L. conigenum* algne
kontsentratsioon (173 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 71

<i>L. conigenum</i> (forward) - 5' CTTCGGGCTCTGTTCTTC 3'
<i>L. pinastri</i> - 5' CTTCGGGCCCTATTCTC 3'
<i>L. seditiosum</i> - 5' CCGCGAGGTGCTATTCTC 3'
<i>L. conigenum</i> (reverse) - 5' GCCACTGATTTTGAAGCGA 3'
<i>L. pinastri</i> - 5' GCCACTGATTTTGAGGCAA 3'
<i>L. seditiosum</i> - 5' GCCACTGATTTTGAGGCAG 3'

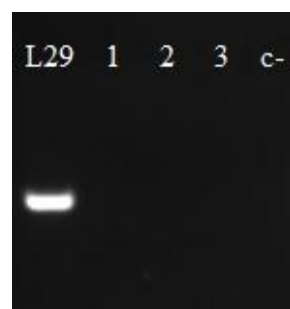
In silico spetsiifilisuse kontroll
L. pinastri – accession nr KC608050
L. seditiosum – accession nr HM060653

Joonis 72



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
c+ – positiivne kontroll (*L. conigenum* puhaskultuuri DNA)
1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 73



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest
puhaskultuuridest eraldatud DNA
proovidel
L14 – *L. conigenum* puhaskultuuri DNA
1 – *L. seditiosum* puhaskultuuri DNA
2 – *L. pinastri* puhaskultuuri DNA
3 – *L. piceae* puhaskultuuri DNA
c- – negatiivne kontroll

***Lophodermium pinastri* spetsiifilised PCR praimerid**

Lophodermium pinastri spetsiifilised PCR praimerid disainiti mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku DNA (mtSSU rDNA) järjestuse põhjal. Algselt disainiti üks päripidine praimer (LoPi-F) ja kaks äraspidist praimerit (LoPi-R ja LoPi-R2), milledest valiti edaspidisteks analüüsideks LoPi-R2, mis andis praimeripaarile oluliselt suurema tundlikkuse (LoPi-R kasutades oli sama tundlikkuse saavutamiseks vaja viis PCR tsüklit enam) (vt tabel 5).

Disainitud praimerite pikkus on 22 (LoPi-F) ja 23 (LoPi-R2) nukleotiidi ning praimerite GC sisaldused on vastavalt 41% ja 39%. Liigispetsiifiliste praimeritega amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on 145 bp. LoPi-F ja LoPi-R2 arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 62 °C ja 64 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 50 °C ja 53 °C. LoPi-F moodustatava nõelasilma struktuuri stabiilseima vormi delta G väärtus on -1,07 kcal/mol ja stabiilseima homodimeeri delta G väärtus -3,61 kcal/mol. LoPi-R2 puhul on vastavad delta G väärtused 0,37 kcal/mol ja -7,05 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -5 kcal/mol.

Praimerite võimet detekteerida *L. pinastri* DNA-d erinevatest bioloogilistest proovidest testiti kasutades kahest erinevast puhaskultuurist (EPS 56 139913 ja EPS 56 139914) eraldatud DNA-d ja nakatunud hariliku männi (*Pinus sylvestris*) okastest eraldatud DNA-d (vt joonis 74). *L. pinastri* tuvastamine puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidest õnnestus nii praimerite paariga LoPi-F + LoPi-R kui ka LoPi-F + LoPi-R2, kuid mõlemal juhul oli ühe kultuuri (EPS 56 139914) puhul geelelektroforeesil visualiseeritud PCR produkti bänd oluliselt nõrgem (vt joonis 75). Arvestades, et universaalseid primereid (ITS1f + ITS4) kasutades olid bändid mõlema puhaskultuuri DNA puhul võrdse tugevusega, siis võib ühe puhaskultuuri puhul kahtlustada mitte-komplementaarseid positsioone LoPi-F ja LoPi-R2 praimerite seondumissaitides. Liigisisene varieeruvus praimerite seondumisaladel võib praimerite kasutamist komplitseerida.

Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur on 60 °C ja kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur 64 °C (vt joonis 75a). Minimaalne praimerite testimisel detekteeritud DNA kontsentratsioon oli LoPi-F ja LoPi-R2 primereid kasutades 0,25 pg/μl (vt joonis 75b). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 64 °C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite spetsiifilisust testiti *in silico* võrreldes praimerite järjestusi geenipangas olevate järjestustega, seal hulgas ka teiste

perekonna *Pinastri* liikide (näiteks *L. conigenum* ja *L. seditiosum*) vastavate DNA järjestustega (vt joonis 76). Eksperimentaalselt kontrolliti praimerite liigspetsiifilisust kasutades PCR reaktsioonis kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 77) ning järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Lophodermium seditiosum*, *Lophodermium conigenum*, *Lophodermium piceae* (vt joonis 78). Mitte üksi spetsiifilisuse kontrollimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud liigspetsiifiliste praimerite testimisel positiivset tulemust.

Joonis 74



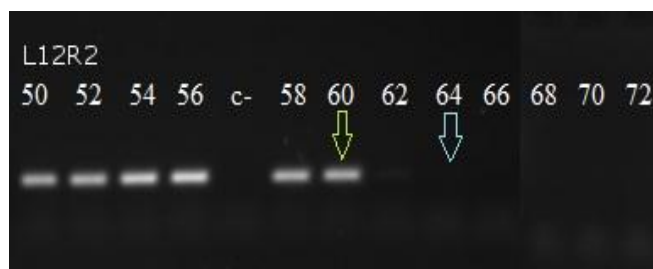
Test erinevate tüvedega
L12 – EPS 56 139913
L13 – EPS 56 139914
c- – negatiivne kontroll

Joonis 75



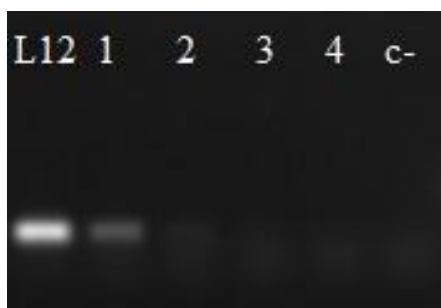
Test nakatunud substraadil
L12 – *L. pinastri* puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi DNA
c- – negatiivne kontroll

Joonis 75a



Seandumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeimat spetsiifilisust tagav At

Joonis 75b



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L12 – algne kontsentratsioon (25 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 76

L. pinastri (forward) - 5' CTTACGGAGTAGAGATGAAATC 3'
L. conigenum - 5' CTTACGGAGTAGAGTTGAAATT 3'
L. piceae - 5' TTTATGGAGTAGAGATGAAATT 3'

L. pinastri (reverse) - 5' CATCATTATCTGCATGGACTACA 3'
L. conigenum - 5' CATAATTATCTGCATGGACTACT 3'
L. piceae - 5' CATCATTTTCTGCATGGACTACT 3'

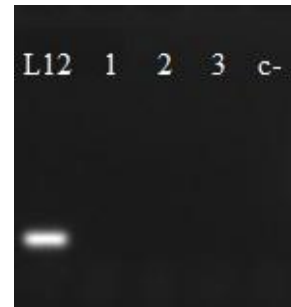
In silico spetsiifilisuse kontroll
L. conigenum – accession nr HM143813
L. piceae – accession nr HM143825

Joonis 77



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*L. pinastri* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 78



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L12 – *L. pinastri* puhaskultuuri DNA
 1 – *L. seditiosum* puhaskultuuri DNA
 2 – *L. conigenum* puhaskultuuri DNA
 3 – *L. piceae* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

***Lophodermium seditiosum* spetsiifilised PCR praimerid**

Lophodermium seditiosum spetsiifilised PCR praimerid disainiti ITS1 ning ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimerid (LoSe-F) seondumissait asub ITS1 regioonis 66 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ning äraspidise praimerid (LoSe-R) seondumissait ITS2 regioonis 30 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

LoSe-F ja LoSe-R pikkused on 18 ja 20 nukleotiidi ning praimerite GC nukleotiidide sisaldused 61% ja 60%. Praimeritega amplifitseeritava DNA lõigu pikkus on 342 bp. Arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 58 °C ja 64 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 60 °C ja 59 °C. LoSe-F moodustatava stabiilseima nõelasilma struktuuri delta G väärtus on -1,17 kcal/mol ning stabiilseima homodimeeri delta G väärtus -9,89 kcal/mol. LoSe-R jaoks on vastavad delta G väärtused 1,32 kcal/mol ja -3,14 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri minimaalne delta G väärtus on -8,03 kcal/mol.

Liigispetsiifiliste praimerite funktsionaalsust testiti positiivsete tulemustega kasutades *L. seditiosum* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ja nakatunud hariliku männi (*Pinus sylvestris*) ja musta männi (*Pinus nigra*) okastest puhastatud DNA-d (vt joonis 79). Praimerite eksperimentaalselt määratud optimaalseim seondumistemperatuur on 64 °C ja kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur 67 °C (vt joonis 79a). Minimaalne tuvastatav DNA kogus PCR reaktsioonisegu kohta oli 0,71 pg (vt joonis 80). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 67 °C viies läbi 35 PCR tsükli ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 67 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Disainimisel kontrolliti

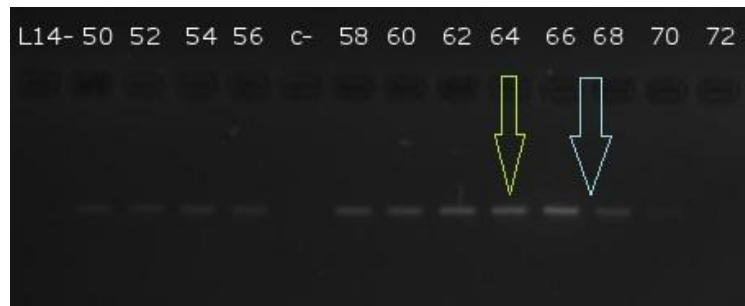
praimerite spetsiifilisust *in silico* võrreldes nende järjestusi teiste geenipangas olevate järjestustega, pöörates seejuures tähelepanu ka fülogeneetiliselt lähedastele liikidele (vt *joonis 81*). Praimerite spetsiifilisuse eksperimentaalsel kontrollimisel kasutati PCR reaktsioonis kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt *joonis 81a*) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Lophodermium conigenum*, *Lophodermium pinastri*, *Lophodermium piceae* (vt *joonis 81b*). Kõik spetsiifilisuse testimisel kasutatud proovid andsid negatiivse tulemuse.

Joonis 79



Test nakatunud substraadil
L14 – *L. seditiosum*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 79a



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 80



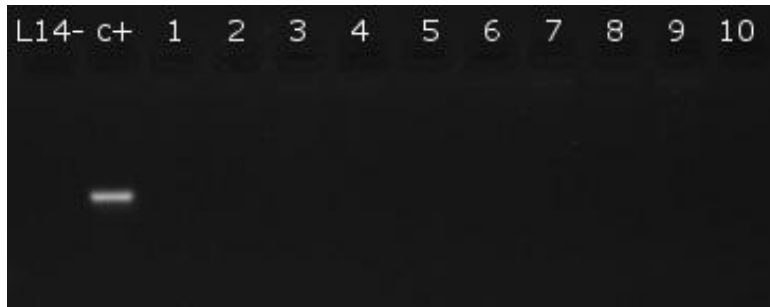
Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L14 – *L. seditiosum* algne
kontsentratsioon (71 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 81

<i>L. seditiosum</i> (forward) - 5' ACAGCGCCAGCGGATTGA 3'
<i>L. pinastri</i> - 5' TCGGCGCCAGTGGAAACGA 3'
<i>L. conigenum</i> - 5' ACCGCGCCAGTGGATCGA 3'
<i>L. seditiosum</i> (reverse) - 5' CCTGCTGTCCTTCCCTACCA 3'
<i>L. pinastri</i> - 5' TTCAGCGGGTATCCCTACCT 3'
<i>L. conigenum</i> - 5' TTCAGCGGGTATCCCTACCT 3'

In silico spetsiifilisuse kontroll
L. pinastri – accession nr HM060664
L. conigenum – accession nr KC283118

Joonis 81a



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*L. seditiosum* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 81b



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L14 – *L. seditiosum* puhaskultuuri DNA
 1 – *L. conigenum* puhaskultuuri DNA
 2 – *L. pinastri* puhaskultuuri DNA
 3 – *L. piceae* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

***Mycosphaerella dearnessii* spetsiifilised PCR praimerid**

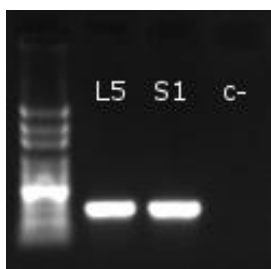
Mycosphaerella dearnessii spetsiifilised PCR praimerid disainiti liigi ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimer (MyDe-F) seondumissait asub ITS1 piirkonnas 119 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ning äraspidise praimer (MyDe-R) seondumissait ITS2 piirkonnas 37 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

MyDe-F ja MyDe-R praimerid on 24 ja 23 nukleotiidi pikad ning praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid (T_m) on Marmur'i valemi järgi 68 °C ja 66 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 54 °C ja 56 °C. Praimerite GC sisaldus on 42% ja 50%. Amplifitseeritava DNA produkti pikkus on *M. dearnessii* spetsiifilisi praimereid kasutades 321 bp. Võimalike praimerite poolt moodustatavate juuksenõela struktuuride delta G väärtused on päripidiste ja äraspidiste praimerite puhul vastavalt 0,7 kcal/mol ja -0,46 kcal/mol. Praimerite homodimeeride jaoks on delta G väärtused -7,05 kcal/mol ja -4,16 kcal/mol ning stabiilseima heterodimeeri delta G väärtus on -5,37.

Praimerite efektiivsust *M. dearnessii* DNA detekteerimisel kontrolliti edukalt kasutades PCR reaktsioonis *M. dearnessii* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ja nakatunud mägimänni (*Pinus mugo*) okastest eraldatud DNA-d (vt joonis 82). Katseliselt osutus optimaalseimaks seondumistemperatuuriks 56 °C ning kõrgeima spetsiifilisuse tagamiseks on võimalik kasutada seondumistemperatuuri 66 °C (vt joonis 83). Minimaalne detekteeritav DNA kogus PCR reaktsioonisegu kohta oli MyDe-F ja MyDe-R praimereid kasutades 0,6 pg (vt joonis 84). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti seondumistemperatuuril 66

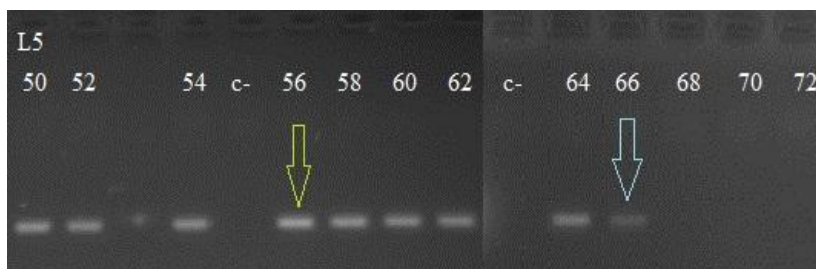
°C viies läbi 35 PCR tsüklit ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Disainitud praimerite spetsiifilisust kontrolliti *in silico* pöörates tähelepanu ka lähedaste liikide nagu *Mycosphaerella pini* ja *Dothistroma pini* diskrimineerimisele (vt joonis 85). Eksperimentaalselt kontrolliti spetsiifilisust kasutades kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 86) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Mycosphaerella pini*, *Mycosphaerella microspora*, *Dothistroma pini* (vt joonis 87). Mitte ükski spetsiifilisuse kontrollimisel kasutatud DNA proovidest ei andnud positiivset tulemust, mis tõestab praimerite spetsiifilisust.

Joonis 82



Test nakatunud substraadil
L5 – *M. dearnessii*
puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 83



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 84



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L5 – *M. dearnessii* algne
kontsentratsioon (600 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 85

<i>M. dearnessii</i> (forward) - 5' GCCATCTATCAAACCTGCATTAC 3'
<i>M. pini</i> - 5' GGAGGTCATCAAACACTGCATCTT 3'
<i>D. pini</i> - 5' GGAGGTCATCAAACACTGCATCTA 3'
<i>M. dearnessii</i> (reverse) - 5' GCGAACTCCCTAGCGAAAATGTC 3'
<i>M. pini</i> - 5' CCGAACTCTTCAGCGAAA - TATA 3'
<i>D. pini</i> - 5' CCGAACTCTTCAGCGAAA - TATA 3'

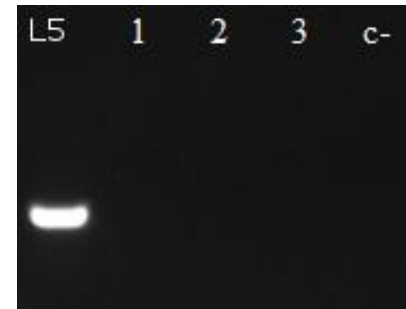
In silico spetsiifilisuse kontroll
M. pini – accession nr KC995004
D. pini – accession nr KF251302

Joonis 86



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*M. dearnessii* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 87



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidel
 L5 – *M. dearnessii* puhaskultuuri DNA
 1 – *M. pini* puhaskultuuri DNA
 2 – *M. microspora* puhaskultuuri DNA
 3 – *D. pini* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

***Phellinus tremulae* spetsiifilised PCR praimerid**

Phellinus tremulae spetsiifilised PCR praimerid disainiti ITS1 ja ITS2 regioonide DNA järjestuste põhjal. Päripidise praimer (PheTre-F) seondumissait paikneb ITS1 regioonis 152 bp kaugusel ribosoomi 18S subühiku geeni lõpust ja äraspidise praimer (PheTre-R) seondumissait ITS2 regioonis 52 bp kaugusel ribosoomi 28S subühiku geeni algusest (vt tabel 5).

PheTre-F ja PheTre-R pikkused on vastavalt 22 ja 20 nukleotiidi ning praimeritega amplifitseeritava PCR produkti pikkus on 391 bp. Liigispetsiifiliste praimerite GC nukleotiidide sisaldused on 46% ja 55%. Päripidiste ja äraspidiste praimerite arvutuslikud denatureerumistemperatuurid on Marmur'i valemi järgi 64 °C ja 62 °C ning IDT OligoAnalyzer 3.1 järgi 56 °C mõlema praimer puhul. PheTre-F moodustatava nõelasilma struktuuri minimaalne delta G väärtus on -0,59 kcal/mol ja praimer homodimeeri minimaalne delta G väärtus -5,47 kcal/mol. PheTre-R jaoks on vastavad delta G väärtused -1,47 kcal/mol ja -5,5 kcal/mol. Praimerite heterodimeeri stabiilseima vormi delta G väärtus on -5,24 kcal/mol.

Praimerite funktsionaalsust kontrolliti detekteerides *P. tremulae* DNA-d proovidest, mis olid eraldatud *P. tremulae* puhaskultuurist ja nakatunud hariliku haava (*Populus tremula*) puidust (vt joonis 88). Eksperimentaalselt määratud optimaalne seondumistemperatuur ja kõrgeim efektiivne seondumistemperatuur on *P. tremulae* spetsiifiliste praimerite puhul vastavalt 64 °C ja 68 °C (vt joonis 89). Minimaalne tuvastatav DNA kogus oli 1,52 pg reaktsioonisegu kohta (vt joonis 90). Praimerite funktsionaalsust ning tundlikkust testiti

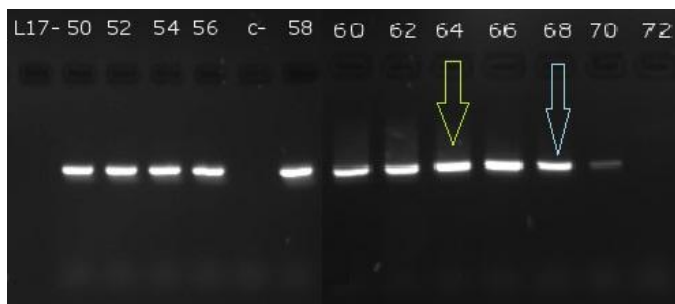
seondumistemperatuuril 68 °C viies läbi 35 PCR tsükli ((1x 95 °C 15 min), (35x 95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min), (1x 72 °C 10 min)). Praimerite disainimisel kontrolliti nende liigspetsiifilisust *in silico* võrreldes praimerite nukleotiidseid järjestusi geenipangas olevate sarnaste järjestustega, sealhulgas ka sama perekonna liikide, näiteks *P. alni* ja *P. laevigatus* vastavate regioonide järjestustega (vt joonis 91). Eksperimentaalselt kontrolliti praimerite liigspetsiifilisust kasutades PCR reaktsioonis kümnest mullaproovist eraldatud DNA-d (vt joonis 92) ja järgmiste liikide puhaskultuuridest eraldatud DNA-d – *Phellinus populicola*, *Phellinus cinerea*, *Phellinus alni*, *Phellinus nigricans*, *Phellinus igniarius* (vt joonis 93). Kõik spetsiifilisuse kontrollimisel kasutatud DNA proovid andsid testimisel negatiivse tulemuse.

Joonis 88



Test nakatunud substraadil
L17 – *P. tremulae* puhaskultuuri DNA
S1 – nakatunud substraadi
c- – negatiivne kontroll

Joonis 89



Seondumistemperatuuride (At) analüüs
50-72 – At (°C)
c- – negatiivne kontroll
roheline nool – optimaalne At
sinine nool – kõrgeim efektiivne At

Joonis 90



Sensitiivsuse test DNA lahjendustel
L17 – *P. tremulae* algne kontsentratsioon
(152 pg/μl)
1-4 – 10x lahjenduste seeria
c- – negatiivne kontroll

Joonis 91

<i>P. tremulae</i> (forward) - 5' TCGTCGGTGAACACTTCAACTA 3'
<i>P. alni</i> - 5' TTGTCGGCGAACACTTCAAGTA 3'
<i>P. laevigatus</i> - 5' TTGTCGGCGAACACTTCAACTA 3'
<i>P. tremulae</i> (reverse) - 5' CTTGTTAGGCAAGCGTCCAG 3'
<i>P. alni</i> - 5' CTTGTTAGGCAAGCGCTCAG 3'
<i>P. laevigatus</i> - 5' CTTGTTAGGCAAGCGCTCAG 3'

In silico spetsiifilisuse kontroll
P. alni – accession nr GQ383769
P. laevigatus – accession nr GQ383779

Joonis 92



Spetsiifilisuse kontroll mullast eraldatud DNA proovidel
 c+ – positiivne kontroll (*P. tremulae* puhaskultuuri DNA)
 1-10 – erinevatest mullaproovidest eraldatud DNA

Joonis 93



Spetsiifilisuse kontroll erinevatest
 puhaskultuuridest eraldatud DNA
 proovidel
 L17 – *P. tremulae* puhaskultuuri DNA
 1 – *P. populicola* puhaskultuuri DNA
 2 – *P. cinerea* puhaskultuuri DNA
 3 – *P. alni* puhaskultuuri DNA
 4 – *P. nigricans* puhaskultuuri DNA
 5 – *P. igniarius* puhaskultuuri DNA
 c- – negatiivne kontroll

Kokkuvõte

Käesoleva töö tulemusena töötati välja 17 spetsiifilist praimerite paari, mis võimaldavad 17 seeneliigi- ja perekonna, sealhulgas 14 olulise taimede seenpatogeeni efektiivset ja kiiret tuvastamist erinevatest bioloogilistest proovidest konventsionaalsel PCR meetodil. Disainitud primereid kasutades õnnestus perekondada *Alternaria*, *Armillaria* ja *Fusarium* ning liikide *D. sapinea*, *D. scrobiculata*, *D. pini*, *G. abietina*, *H. juniperi*, *H. annosum*, *H. albidus*, *H. pseudoalbidus*, *L. macrospora*, *L. conigenum*, *L. pinastri*, *L. seditiosum*, *M. dearnessii* ja *P. tremulae* detekteerimine nii puhaskultuuridest eraldatud DNA proovidest kui seennakkusega peremeestaimedest eraldatud DNA-st.

Praimerite kõrge spetsiifilisuse tagamiseks testiti nende kasutamist seondumistemperatuuridel 50-72 °C, et teha kindlaks kõrgeim seondumistemperatuur, mis tagab sihtmärgiks oleva liigi või perekonna DNA piisavalt efektiivse amplifitseerimise. Võimalikult kõrge seondumistemperatuuri kasutamine vähendab tõenäosust, et praimerid seonduvad sihtmärgiks mitte olevatele DNA järjestustele ja suurendab seega PCR reaktsiooni efektiivsust ja spetsiifilisust.

Praimerite spetsiifilisuse tõestamiseks viidi läbi PCR reaktsioonid kasutades mullaproovidest eraldatud DNA-d ja fülogeneetiliselt lähedaste ning samu peremeestaimi nakatavate seeneliikide DNA-d. Spetsiifilisuse testide valideerimiseks sekveneeriti kõigi positiivse tulemuse andnud DNA proovide PCR produktid ja sekveneerimisel saadud järjestuste fülogeneetiline analüüs näitas, et kõik selle töö raames disainitud primersed amplifitseerisid ainult sihtmärgiks olnud seeneliigi- või perekonna DNA-d. Praimerite eksperimentaalselt kontrollitud spetsiifilisus näitab, et primereid on võimalik kasutada sihtmärgiks olevate seente detekteerimiseks ka sellistest bioloogilistest proovidest, mis sisaldavad suurel hulgal erinevate organismide geneetilist materjali või mõne fülogeneetiliselt lähedase liigi DNA-d.

Minimaalne sihtmärgiks oleva DNA kogus, mille detekteerimist praimerid võimaldavad, tehti kindlaks kasutades PCR reaktsioonis DNA 10x lahjenduste seeriat. Minimaalsed detekteeritavad DNA kogused 25 µl reaktsioonisegu kohta jäid vahemikku 0,0138-802 pg. Seejuures võib madalamat tundlikkust näidanud *Alternaria* ja *G. abietina* praimerite tulemust seletada testimisel kasutatud DNA suhteliselt madal kvaliteet, sest PCR produkti võõt geelil oli nõrk ka DNA kvaliteedi testimisel universaalsete ITS praimeritega.

Patogeensed seened põhjustavad märkimisväärt majanduslikku kahju vähendades nii looduslike kui põllumajanduslike kultuuride tootlikkust. Patogeense seennakkuse õigeaegne

tuvastamine looduslikes kooslustes ja põllumajanduslikes kultuurides annab võimaluse rakendada meetmeid patogeense nakkuse edasise levimise takistamiseks ja seenpatogeenide põhjustatava majandusliku kahju vähendamiseks. Patogeenide tuvastamise meetodid, mis eeldavad patogeense seene puhaskultuuri viimist ja määramist morfoloogiliste tunnuste põhjal, eeldavad taksonoomiaalseid teadmisi ja kogemusi. Käesolevas töös kirjeldatud taimede seenpatogeenide spetsiifilised PCR praimerid annavad võimaluse kontrollida lühikese ajaga seennakkuse olemasolu suures hulgas bioloogilistes proovides ning võimaldavad seejuures patogeeni täpset taksonoomilist identifitseerimist. Konventsionaalse PCR meetodi ja spetsiifiliste praimerite kasutamine seennakkuse tuvastamiseks ei eelda bioloogiliste proovide analüüsijalt taksonoomiaalseid või molekulaarbioloogilisi teadmisi, seega saavad seda meetodit kasutada kõik taimekaitse valdkonnaga seotud inimesed ja institutsioonid.

Summary

PCR primers for the detection of plant pathogens

As a result of this work 17 specific primer pairs were developed which facilitate the effective and fast detection of 17 fungal species and families, including 14 significant fungal plant pathogens, from various biological samples using the conventional PCR method. The primers were successfully used in detecting the families *Alternaria*, *Armillaria* and *Fusarium* as well as the species *D. sapinea*, *D. scrobiculata*, *D. pini*, *G. abietina*, *H. juniperi*, *H. annosum*, *H. albidus*, *H. pseudoalbidus*, *L. macrospora*, *L. conigenum*, *L. pinastri*, *L. seditiosum*, *M. dearnessii* and *P. tremulae* from DNA samples purified from pure cultures and host plants with a fungal infection.

The primers were tested at annealing temperatures of 50-72 °C to optimize their specificity and to determine the highest annealing temperature at which the primers retain sufficiently high amplification effectiveness. Using the highest effective annealing temperature reduces the probability of mispriming and thereby increases the effectiveness and specificity of the PCR reaction.

A series of PCR reactions were carried out using DNA purified from soil samples and phylogenetically related species or species which infect the same host plant in order to confirm the specificity of the primers. To validate the results of the specificity testing all the PCR products of the DNA samples that had given a positive result were sequenced. Analysis of the obtained sequences confirmed that only the DNA of the target fungal species or families had been amplified. The experimentally confirmed specificity of the primers shows that the primers can be used to detect target fungi even from samples which contain a large amount of genetic material from various organisms or the DNA of phylogenetically close species.

The detection limit of the designed primers was determined by carrying out PCR reaction using a series of 10x DNA dilutions. The minimum amount of DNA that was detected from the 25 µl reaction mixture ranged from 0,0138 to 802 pg. The weak performance of the *Alternaria* and *G. abietina* specific PCR primers may be explained by low quality DNA as the DNA quality test which was carried out using universal ITS primers also yielded faint bands.

Pathogenic fungi cause significant economic damage by reducing the production of both natural and agricultural cultures. Early detection of pathogenic infection would facilitate the use of measures to prevent the spread of the infection and to reduce the economic losses

caused by fungal plant pathogens. The methods of pathogen detection which require isolation of the pathogenic organism followed by morphological analysis can be carried out by people with expert knowledge and experience in the field of taxonomy. The fungal pathogen specific primers described in this paper allow for the analysis of many biological samples in a short amount of time and make it possible to determine the identity of the pathogenic organism very precisely. The conventional PCR method using specific primers does not require knowledge in taxonomy or molecular biology and can thus be applied by any person or institution involved in plant protection.

Kasutatud kirjandus

- Akanmu, A. O., M. A. Abiala, A. C. Odebode. 2013. Pathogenic Effect of Soilborne Fusarium Species on the Growth of Millet Seedlings. *World Journal of Agricultural Sciences* 9 (1): 60-68.
- Altschul, S. F., W. Gishl, W. Miller, E. W. Myers, J. David. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Bell, J. R. 2008. A Simple Way to Treat PCR Products Prior to Sequencing Using ExoSAP-IT[®]. *BioTechniques* 44 (6): 834.
- Blodgett, J. T., G. R. Stanosz. 1997. Sphaeropsis sapinea morphotypes differ in aggressiveness, but both infect nonwounded red or jack pines. *Plant Dis.* 81:143-147
- Bridge, P., B. Spooner. 2001. Soil fungi: Diversity and detection. *Plant Soil* 232: 147-154
- Burdon, J. J., J. Silk. 1997. Sources and Patterns of Diversity in Plant-Pathogenic Fungi. *Phytopathology* 87: 664-669
- Capote, N., A. M. Pastrana, A. Aguado, P. Sánchez-Torres. 2012. Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. *Plant Pathology*: 151-202.
- Dieffenbach, C. W., T. M. Lowe, G. S. Dveksler. 1993. General Concepts of Primer Design. *Genome Research* 1993 (3): 30-37.
- Diwani, S. A., C. S. Millar. 1987. Pathogenicity of three Lophodermium species on Pinus sylvestris L. *European Journal of Forest Pathology* 17: 53–58.
- Gardes, M., T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113–118.
- Gouy M., S. Guindon S, O. Gascuel. 2010. SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224.
- Groenewald, M., I. Barnes, R. E. Bradshaw, A. V. Brown, A. Dale, J. Z. Groenewald, K. J. Lewis, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, P. W. Crous. 2007. Characterization and

Distribution of Mating Type Genes in the Dothistroma Needle Blight Pathogens.
Phytopathology 97 (7): 825-834.

Hennon, P. E. 1990. Sporulation of *Lirula macrospora* and symptom development on Sitka spruce in southeast Alaska. Plant Disease 74 (4): 316-319.

Jeewon, R., J. Ittoo, D. Mahadeb, Y. Jaufeerally-Fakim, H. K. Wang, A. R. Liu. 2013. DNA Based Identification and Phylogenetic Characterisation of Endophytic and Saprobiic Fungi from *Antidesma madagascariense*, a Medicinal Plant in Mauritius. Journal of Mycology 2013.

Kang, S., M. A. Mansfield, B. Park, D. M. Geiser, K. L. Ivors, M. D. Coffey, N. J. Grünwald, F. N. Martin, C. A. Lévesque, J. E. Blair. 2010. The promise and pitfalls of sequence-based identification of plantpathogenic fungi and oomycetes. Phytopathology 100:732-737

Karadžić, D., S. Milanović. 2008. *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet: Distribution in Serbia and Montenegro, Significance and Control. ГЛАСНИК ШУМАРСКОГ ФАКУЛТЕТА, БЕОГРАД 98: 107-116.

Katoh, K., K. Misawa, K. Kuma, T. Miyata. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res. 30 (14): 3059-3066.

Korhonen, K, J. Stenlid. 1998. Biology of *Heterobasidion annosum* In: *Heterobasidion annosum. Biology, Ecology, Impact, and Control*. CAB International, UK: 43–71.

La Porta, N. 2000. *Mycosphaerella dearnessii*, a Needle-cast Pathogen on Mountain Pine (*Pinus mugo*) in Italy. Plant Disease 84 (8): 922.1-922.1.

Mallett, K. I. 1990. Host range and geographic distribution of *Armillaria* root rot pathogens in the Canadian prairie provinces. Can. J. For. Res. 20: 1859-1863.

Mamgain, A., R. Roychowdhury, J. Tah. 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. Research Journal of Biology 1: 1-9.

Marmur, J., P. Doty. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5: 109–118.

- Muller-Landau, H. C. 2014. Ecology: Plant diversity rooted in pathogens. *Nature* 506: 44-45
- Mullis, K.B., F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Neumann, B., A. Pospiech, H. U. Schairrer . 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Trends Genet.* 8: 332–333.
- Niemela, T. 1974. On Fennoscandian polypores. III. *Phellinus tremulae* (Bond.) Bond. and Borisov. *Annales Botanici Fennici* 11 (3): 202-215.
- Palm, M. E. 2001. Systematics and the Impact of Invasive Fungi on Agriculture in the United States. *BioScience* 51 (2): 141-147
- Queloz, V., C. R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber, O. Holdenrieder. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology* 41: 133–142
- Remm, M., A. Kurg, A. Metspalu. 2010. Primer Design for Large-Scale Multiplex PCR and Arrayed Primer Extension. *PCR Technology: Current Innovations*, Second Edition: 103-110.
- Rottstock, T., J. Joshi, V. Kummer, M. Fischer. 2014. Higher plant diversity promotes higher diversity of fungal pathogens, while it decreases pathogen infection per plant. *Ecology*. <http://dx.doi.org/10.1890/13-2317.1>
- Scheuer, C. 2000. An annotated list of the ascomycetes on Cyperaceae and Juncaceae recorded from the Eastern Alps by Scheuer (1988), including important corrections (Scheuer 2000). - Graz, Austria: Institut für Botanik der Karl-Franzens-Universität.
- Schneider, M., O. Holdenrieder. 2009. Cryptic speciation and community structure of *Herpotrichia juniperi*, the causal agent of brown felt blight of conifers. *Mycological Research* 113 (8): 887-896.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (16): 6241-6246.

- Shivas, R. G., L. Cai. 2012. Cryptic fungal species unmasked. *Microbiology Australia* 33 (1): 36-37
- Stadhouders, R., S. D. Pas, J. Anber, J. Voermans, T. H. M. Mes, M. Schutten. 2010. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *J Mol Diagn.* 12 (1): 109-117.
- Tiselius, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society* 33: 524–531.
- Watrud, L. S., K. Martin, K. K. Donegan, J. K. Stone, C. G. Coleman. 2006. Comparison of taxonomic, colony morphotype and PCR-RFLP methods to characterize microfungi diversity. *Mycologia* 98 (3): 384-392
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*: 315-322.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Taavi Riit _____

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 08.10.1985 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks

mille juhendaja on _____ Leho Tedersoo, Rein Drenkhan _____,

(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, __26.05.2014_____ (*kuupäev*)